SÉRIE E - N° D'ORDRE 209 • ANNÉE 1961

THÈSES

présentées à la

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

pour obtenir

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS-SCIENCES NATURELLES

par

Alexandre PETROVIC
Docteur en Médecine
Maître de Recherche à l'Institut National d'Hygiène

PREMIÈRE THÈSE

Recherches sur la préhypophyse en culture organotypique : évolution structurale et action sur les organes-effecteurs associés *in vitro*

DEUXIÈME THÈSE

Les variétés cellulaires de la préhypophyse

Soutenues le 11 décembre 1961 devant la Commission d'examen :

M. VIVIEN, *Président – Doyen de la Faculté des Sciences*
M. STUTINSKY, *Examinateur – Professeur à la Faculté des Sciences*
M. LEVI, *Examinateur – Professeur à la Faculté des Sciences*
M. KAYSER, *Examinateur – Professeur à la Faculté de Médecine*

IMPRIMERIE ALSATIA COLMAR

SÉRIE E - N° D'ORDRE 209 • ANNÉE 1961

THÈSES

présentées à la

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

pour obtenir

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS-SCIENCES NATURELLES

par

Alexandre PETROVIC

Docteur en Médecine

Maître de Recherche à l'Institut National d'Hygiène

PREMIÈRE THÈSE

Recherches sur la préhypophyse en culture organotypique : évolution structurale et action sur les organes-effecteurs associés *in vitro*

DEUXIÈME THÈSE

Les variétés cellulaires de la préhypophyse

Soutenues le 11 décembre 1961 devant la Commission d'examen :

M. VIVIEN, *Président – Doyen de la Faculté des Sciences*
M. STUTINSKY, *Examinateur – Professeur à la Faculté des Sciences*
M. LEVI, *Examinateur – Professeur à la Faculté des Sciences*
M. KAYSER, *Examinateur – Professeur à la Faculté de Médecine*

IMPRIMERIE ALSATIA COLMAR

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41550011_0005

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

Doyen : M. le Professeur J. H. VIVIEN

Doyens Honoraires :

MM. A. DANJON, A. KIRRMANN, P. LACROUTE, H. J. MARESQUELLE,

Professeurs Honoraires :

MM. Ed. BAUER
P. DE BEAUCHAMP
L. BOUNOURE
H. CARTAN
Cl. CHABAUTY
A. CHRÉTIEN
A. DANJON
J. DENY
Ch. EHRESMANN

MM. M. FRÉCHET
G. FOEX
H. GAULT
L. HACKSPILL
A. HEE
Mme A. HEE
MM. R. HOCART
A. KIRRMANN
G. LEMÉE

MM. P. L'HÉRITIER
A. LICHNEROWICZ
L. NEEL
H. OLLIVIER
G. RIBAUD
E. TERROINE
R. THIRY
H. VILLAT
Et. WOLFF

Professeurs :

MM.	H. WEISS - T.	Physico-Chimie des Hydrocarbures
	G. HUGEL - T.	Chimie du Pétrole
	R. BONNET - T.	Chimie Biologique
	H. J. MARESQUELLE - T.	Biologie végétale
	A. ROUSSEL - T.	Calcul différentiel et intégral et théorie des fonctions
	H. FORESTIER - T.	Chimie générale
	Ch. SADRON - T.	Physico-Chimie macromoléculaire
	J. ROTHÉ - T.	Physique du Globe
	P. LACROUTE - T.	Astronomie
	J. H. VIVIEN - T.	Zoologie et Embryologie expérimentale
	L. BOISSELET - T.	Chimie analytique du Pétrole
	A. MAILLARD - T.T.P.	Chimie
	S. GORODETZKY - T.	Physique générale et Physique nucléaire.
	L. SACKMANN - T.T.P.	Mécanique des Fluides
	J. BYÉ - T.	Chimie minérale et Chimie physique
	R. LOMBARD - T.	Chimie organique
Mlle	M. PEREY - T.	Chimie nucléaire
MM.	Ph. PLUVINAGE - T.	Physique expérimentale
	S. GOLDSZTAUB - T.	Minéralogie et Pétrographie
	P. JOLY - T.	Biologie générale
	H. BENOIT - T.	Physique générale
	J. L. KOSZUL - T.	Topologie
	P. CUER - T.	Physique générale et Physique corpusculaire
	G. VIAUD - T.	Psycho-Physiologie

	G. Millot - T.	Géologie et Paléontologie
	R. Lecolazet - P.S.C.	Physique du Globe
	H. Saucier - T.T.P.	Minéralogie
	R. Rohmer - T.T.P.	Chimie
Mlle	S. Gillet - T.T.P.	Paléontologie
Mlle	A. Gagnieu - T.T.P.	Botanique
MM.	R. Thom - T.	Mécanique rationnelle
	S. Nikitine - T.	Physique générale
	F. Stutinsky - T.	Physiologie générale
	B. Wurtz - P.S.C.	Chimie biologique
	J. Brenet - T.T.P.	Chimie physique
	G. Ourisson - T.T.P.	Chimie
	Fr. Stéphan - P.S.C.	Zoologie
	Cl. Lévi - T.T.P.	Biologie générale
	A. Coche - P.S.C.	Physique nucléaire
	R. Cerf - T.T.P.	Physique
	M. Berger - P.S.C.	Mathématiques
	J. Frenkel - P.S.C.	Mathématiques
	P. Taglang - T.	Physique
	J. P. Lonchamp - P.S.C.	Physique
	J. Boscher - P.S.C.	Mécanique des Fluides
	A. Deluzarche - P.S.C.	Chimie
	J. B. Donnet - T.T.P.	Chimie physique
	R. Armbruster - P.S.C.	Physique
	A. Roche - P.S.C.	Physique du Globe
	L. Hirth - T.	Microbiologie
	J. Yoccoz - T.	Physique théorique

Maîtres de Conférences :

MM.	J. Parrod	Chimie
	A. Sigot	Zoologie
	J. Cogné	Géologie
	R. Wey	Minéralogie
	J. Wucher	Physique
	A. Fuchs	Mathématiques
Mme	D. Magnac	Physique
Mme	N. Brini	Chimie
MM.	A. Gallmann	Physique
	M. Daune	Physique
	J. P. Adloff	Chimie nucléaire
	P. Mialhe	Physiologie animale
	J. Grémillard	Mathématiques
	G. Perny	Physique
	J. Levisalles	Chimie
	D. Bernard	Méthodes Mathématiques de la Physique
	R. Baro	Physique
	G. Lapraz	Botanique

H. Danan	Physique
M. Zisman	Mathématiques
E. Daniel	Physique
F. Norguet	Mathématiques
P. Chevallier	Physique
J. Leray	Physique
H. Duranton	Botanique
R. Weiss	Chimie
P. Cartier	Mathématiques

Secrétaire : M. G. Saint-Pé

AVANT-PROPOS

Depuis plusieurs années, nous nous sommes consacré à l'étude de la cellule, de ses aspects morphologiques et physiologiques.

Notre première formation scientifique et notre orientation médicale nous ont guidé vers le Laboratoire de recherche. Notre père, le Docteur G. PETROVIC, issu de l'Ecole Chirurgicale de Strasbourg, a été le premier à éveiller notre curiosité pour la physiologie et la physiopathologie tissulaires. Ainsi avons-nous reçu, dès 1948, l'initiation histologique auprès de Monsieur le Professeur Max ARON, Directeur de l'Institut d'Histologie à la Faculté de Médecine de Strasbourg, à qui nous exprimons notre respectueuse gratitude. C'est une faveur que d'avoir bénéficié, dans les premières années de notre carrière scientifique, d'une grande tradition de l'endocrinologie classique.

Après avoir soutenu, en 1954, notre thèse de Doctorat en Médecine, nous avons préparé le Certificat d'Etudes Spéciales d'Hématologie. L'étude de la physiologie et de la pathologie du sang et des organes hématopoïétiques nous a offert un nouvel aspect de la biologie cellulaire.

C'est un privilège pour nous d'avoir pu réaliser cette thèse sous la direction de Monsieur le Professeur J. H. VIVIEN, Doyen de la Faculté des Sciences de Strasbourg, notre Maître, qui nous l'a suggéré et, suivant pas à pas nos recherches, nous en a tracé les cadres. Nous avons trouvé dans son Laboratoire cette liberté de travail qui conditionne l'indépendance de l'esprit chez le chercheur.

Nous remercions Monsieur le Doyen J. H. VIVIEN de nous avoir guidé naguère vers les études scientifiques et de nous avoir témoigné sa confiance en acceptant la présidence de notre thèse.

Dans notre travail une communauté d'esprit et de cœur avec notre Maître, Monsieur le Professeur Ch. KAYSER, Directeur de l'Institut de Physiologie à la Faculté de Médecine de Strasbourg, nous a constamment aidé et nous aide encore à surmonter bien des épreuves. L'attachement dont notre Maître nous a honoré depuis qu'il nous associa en 1955 à ses recherches sur les glandes endocrines des Hibernants, a marqué notre carrière scientifique. Son enseignement nous a permis de prendre connaissance des méthodes modernes en physiologie expérimentale; sa bienveillance a favorisé nos contacts scientifiques avec d'autres Ecoles et avec d'autres chercheurs.

Nous avons pour Monsieur le Professeur KAYSER une profonde reconnaissance et des sentiments d'affectueux dévouement.

Les hommages que nous présentons à nos Maîtres vont particulièrement à Monsieur le Professeur L. BUGNARD, Directeur de l'Institut National d'Hygiène, qui a consenti à encourager notre formation scientifique. Nous remercions Monsieur le Professeur BUGNARD de la sollicitude qu'il a bien voulu nous témoigner.

Notre formation a bénéficié de l'esprit généreux de Monsieur le Professeur FRUHLING, Directeur de l'Institut d'Anatomie Pathologique à la Faculté de Médecine de Strasbourg, qui nous a accueilli dans son Service de Microscopie Electronique et a soutenu nos recherches. Notre ami, le Docteur A. PORTE, nous a aidé à donner une place de choix à l'étude des ultrastructures. Qu'ils veuillent bien croire, tous deux, à nos pensées reconnaissantes.

Nous exprimons notre gratitude à Monsieur le Professeur F. STUTINSKY, Directeur du Laboratoire de Physiologie Générale à la Faculté des Sciences de Strasbourg, qui nous a prodigué des conseils éclairés et qui, en toutes circonstances, a fait preuve de sollicitude à notre égard.

Le mémoire que nous présentons porte encore le sceau de ceux qui nous ont initié à des techniques nouvelles. Monsieur GAILLARD, Professeur à la Faculté de Médecine de Leiden, nous a appris ses méthodes de culture organotypique des glandes endocrines. Monsieur CHÊVREMONT, Professeur à la Faculté de Médecine de Liège, et notre ami, le Professeur J. FREDERIC, nous ont fait acquérir la pratique de la culture cytotypique et de l'étude de la cellule in vivo. *Notre ami, le Professeur agrégé J. LAVILLAUREIX, nous a aidé dans nos premiers essais et a contribué à nos premières réussites de greffe d'organes cultivés. Notre collègue, Monsieur A. HEUSNER, nous a prodigué des conseils précieux en calcul statistique; Madame D. HAY-MORICEAU en radiochromatographie et notre ami, le Professeur agrégé G. GRIGNON, en histochimie préhypophysaire.*

*

Ce sont ces enseignements et ces conseils qui nous ont attaché à la biologie cellulaire

Puisse ce travail être un reflet de l'empreinte de nos Maîtres !

I - INTRODUCTION

« Jamais personne ne peut vivre avec une raison si parfaite que les choses, les années, les événements ne lui apprennent du nouveau. On finit par voir qu'on ignorait ce qu'on croyait connaître, et l'expérience fait rejeter les opinions d'autrefois. »

TERENCE. Cité par William HARVEY in *Exercitatio anatomica, De motu Cordis et Sanguinis in Animalibus.*

L'organe désigné sous le nom d'*hypophysis cerebri* a pendant des siècles intrigué aussi bien les médecins que les philosophes et son rôle dans l'organisme a suscité les hypothèses les plus diverses. Sa véritable signification n'a commencé à se dégager que depuis 75 ans. En ce court laps de temps, une extraordinaire somme de travaux a été consacrée à cette glande maîtresse du système endocrinien qui occupe une situation topographique privilégiée par rapport au système nerveux central auquel elle est reliée par des voies nerveuses et vasculaires.

Les problèmes étudiés plus particulièrement ces dernières années concernent les mécanismes de la régulation nerveuse et neuro-humorale du fonctionnement hypophysaire et les modalités d'intégration des activités endocriniennes.

Le problème du rôle régulateur de l'hypothalamus dans le fonctionnement de la préhypophyse peut être abordé de plusieurs manières. C'est l'interruption des relations hypothalamo-préhypophysaires qui a été l'idée directrice commune aux techniques les plus fréquemment utilisées. Parmi les divers moyens d'investigation, citons :

- la destruction des différents centres hypothalamiques;
- la section chirurgicale ou blocage pharmacodynamique de la tige pituitaire;
- l'hypophysectomie partielle avec ou sans suppression des relations anatomiques entre l'hypothalamus et le reste hypophysaire;
- la greffe d'hypophyse à l'animal normal ou hypophysectomisé;
- la culture organotypique ou cytotypique de la préhypophyse.

Ces dernières années, la culture organotypique a acquis droit de cité en physiologie expérimentale. Aussi avons-nous été conduit à concevoir une recherche systématique sur la préhypophyse en culture organotypique.

Le fonctionnement de la préhypophyse en culture pose, évidemment, de nombreux problèmes. Il était donc nécessaire de délimiter stricte-

ment les questions que nous nous proposions d'étudier. Dans l'état actuel de nos connaissances, il nous a paru prématuré de chercher à résoudre d'emblée un problème précis de physiologie préhypophysaire. C'est pourquoi nous avons commencé par étudier les possibilités qu'offre en endocrinologie expérimentale la méthode de culture organotypique. Ce mémoire est le bilan de nos recherches dans ce domaine jusqu'à ce jour.

Nous avons réuni les résultats obtenus par la culture organotypique de la préhypophyse de Cobaye. Le Cobaye est un rongeur dont la physiologie endocrinienne est à maints égards assez particulière. Aussi avons-nous cherché à remédier à cette singularité au moyen de quelques essais de culture de la préhypophyse du Hamster sauvage, du Rat et du fœtus humain. Nous nous garderons, néanmoins, de toute généralisation hâtive et nous efforcerons de conserver à cette étude son caractère monographique.

Notre étude a d'abord porté sur l'évolution morphologique de la préhypophyse en culture organotypique. Divers procédés de culture ont été mis en œuvre et adaptés aux impératifs de la recherche endocrinologique. La glande cultivée a été étudiée à l'aide des techniques histologiques et histochimiques couramment utilisées à l'heure actuelle. Mais toute analyse des manifestations morphologiques de l'activité endocrinienne reste incomplète aussi longtemps qu'elle ne tient pas compte des modifications ultrastructurales. Aussi avons-nous eu recours à la microscopie électronique, moins pour enrichir l'inventaire de faits morphologiques, que pour saisir l'aspect dynamique des variations structurales.

Les résultats de cette étude nous ont amené à poser le problème de la valeur fonctionnelle des explants préhypophysaires ainsi cultivés d'une part, et la question de savoir si les modifications cytologiques que nous avons observées étaient réversibles d'autre part.

En ce qui concerne le problème de la valeur fonctionnelle, nous avons limité notre étude à l'examen de l'action de l'explant préhypophysaire sur les glandes effectrices associées *in vitro*. Les organes utilisés ont été le testicule, la surrénale et, surtout, la thyroïde : nos recherches ne concernent donc que les fonctions gonadotrope, corticotrope et thyréotrope. Si nous avons choisi d'éprouver ainsi la valeur fonctionnelle des explants de *pars distalis*, c'est que l'association en culture organotypique d'une glande comme la préhypophyse avec un des organes effecteurs est un moyen d'analyser leurs interrelations fonctionnelles à l'abri de l'influence du reste de l'organisme et plus particulièrement des autres glandes endocrines. Celles-ci, en effet, en raison même des relations d'interdépendance qui les unissent dans l'organisme, représentent autant de facteurs variables rendant l'interprétation des résultats en endocrinologie expérimentale souvent très délicate. *In vitro*, par contre, les conditions de milieu sont non pas nécessairement définies du point de vue biologique, biochimique ou biophysique, mais du moins maintenues constantes ou bien variées au

gré de l'expérimentateur, – ce qui simplifie l'analyse de certains problèmes physiologiques. Il va de soi que la référence aux conditions expérimentales exactes est indispensable pour dégager la signification physiologique des phénomènes ainsi observés.

Pour juger de l'effet produit sur les organes effecteurs, nous avons utilisé des techniques histologiques et histochimiques appropriées à l'examen du testicule, de la surrénale et de la thyroïde. Dans le cas de la surrénale et de la thyroïde, nous les avons complétées par des études au microscope électronique. Enfin, comme il est devenu impossible d'apprécier, avec confiance, le fonctionnement de la thyroïde sans procéder à une exploration du métabolisme iodé, il nous est apparu indispensable d'étudier la fixation de l'I^{131} ainsi que les produits organiques des synthèses iodées.

Restait la question de savoir si les modifications cytologiques de l'explant préhypophysaire cultivé *in vitro* étaient réversibles. Pour essayer de résoudre ce problème, nous avons conçu l'idée de faire appel à la technique de la greffe. En effet, nous avons contribué à montrer, au cours de recherches antérieures, que le testicule, l'ovaire et la thyroïde du Cobaye, du Rat et du Hamster sont des milieux favorables à la réussite d'homogreffes durables, d'adulte à adulte, de la préhypophyse, de la thyroïde et de la corticosurrénale (Petrovic, Weill et Deminatti, 1953a, 1953b; M. Aron, Petrovic, Weill et Deminatti, 1953; Petrovic, 1954; Petrovic, 1955; Petrovic et Kayser, 1956, 1957; 1958; Petrovic et Aron, 1957; Petrovic et Lavillaureix, 1958, 1959; Petrovic, 1960a, 1960b). Cette technique nous est apparue comme un procédé susceptible d'être exploité dans une étude des caractères morphologiques et des propriétés fonctionnelles des explants préhypophysaires préalablement cultivés. Aussi avons-nous réalisé chez le Cobaye, normal ou hypophysectomisé, l'homogreffe intratesticulaire, intraovarienne ou intrathyroïdienne des fragments de préhypophyse qui avaient été au préalable cultivés *in vitro* pendant quelques semaines. Ces expériences furent complétées par des essais d'hétérotransplantation intratesticulaire chez le Cobaye et chez le Rat.

II - PLAN GÉNÉRAL

Nous avons adopté pour l'exposé qui va suivre le plan suivant.

Nous commencerons par situer les recherches faisant l'objet de ce travail dans le cadre général des problèmes que nous étudions en donnant un bref aperçu de nos travaux antérieurs sur la greffe et sur le contrôle hypothalamique de la préhypophyse. L'étude du sujet de ce mémoire sera introduit par une esquisse du développement de la culture organotypique, complétée par une analyse des données déjà acquises concernant la préhypophyse cultivée *in vitro*.

Puis un chapitre sera consacré à la description des techniques mises en œuvre dans ce travail.

L'exposition des observations personnelles commencera par la description de l'évolution morphologique de la préhypophyse en culture organotypique. Puis seront présentés les résultats obtenus par culture associée de préhypophyse et de divers organes effecteurs. La confrontation des données de ces deux études conduira aux conclusions cytophysiologiques.

Enfin, nous envisagerons les constatations portant sur les modifications des cellules préhypophysaires cultivées lorsqu'elles sont replacées, par greffe, dans l'organisme.

Pour terminer, nous essayerons de dégager les conclusions que nous semblent comporter les données mises en évidence.

III - HISTORIQUE

1 - Aperçu de nos recherches antérieures sur la greffe et sur le contrôle hypothalamique de la préhypophyse

Les recherches dont il sera fait état au cours de ce travail concernent, nous l'avons dit, l'évolution morphologique et physiologique de la préhypophyse dans les conditions de la culture organotypique. Notre exposé resterait cependant partiel et incomplet s'il ne faisait également allusion à des recherches poursuivies sur le contrôle hypothalamique de l'activité endocrine de la *pars distalis in vivo* (Petrovic et Aron, 1958; Aron et Petrovic, 1959, 1960). Car les résultats de ces deux types d'expériences se recoupent sur de nombreux points.

A la base de notre activité scientifique se trouve une observation que nous avons faite fortuitement., en 1952, au cours des recherches que nous poursuivions avec C. Weill et M. Deminatti à l'Institut d'Histologie de la Faculté de Médecine de Strasbourg et qui a servi de sujet à notre thèse de doctorat en médecine. Notre Maître, le Professeur Max Aron (voir à ce sujet : M. Aron, 1955), nous avait suggéré de reprendre le problème de l'action gonadostimulante directe sur les éléments du testicule et d'en faire une étude chez le Cobaye. Pour ce faire, nous devions mettre en œuvre diverses modalités expérimentales dont l'inoculation de fragments préhypophysaires dans une gonade mâle; cette expérience visait simplement à éprouver les effets gonadotropes locaux que devaient susciter les substances hormonales préformées et libérées à la suite de la lyse du tissu préhypophysaire. En effet, la qualité d'homotransplant du fragment de *pars distalis* le destinait, pensait-on, à être rejeté à plus ou moins brefs délais. Nous pûmes constater qu'il n'en fut rien. Plusieurs semaines après la transplantation, les fragments de *pars distalis* offraient une intégrité morphologique et fonctionnelle. En décembre 1952, dans une communication présentée à la Société de Bio-

logie de Strasbourg (Petrovic, Weill et Deminatti, 1953 d), nous apportions les premiers résultats de nos recherches sur l'implantation de fragments préhypophysaires dans le testicule du Cobaye. Il en ressortait qu'un tel implant devenait un véritable homogreffon, constitué au bout de 3 mois de cellules chromophiles et chromophobes et exerçant une évidente action gonadotrope sur la glande interstitielle et sur les cellules sexuelles.

Inoculés dans le testicule de Cobaye à titre de contrôle, des fragments de thyroïde, de parathyroïde et d'ovaire montraient une évolution analogue à celle de la préhypophyse, ce qui permit de conclure à une véritable homogreffe (Petrovic, Weill et Deminatti, 1953 a, 1953 b; M. Aron, Petrovic, Weill et Deminatti, 1953; Petrovic, 1954).

On put croire un temps que le testicule du Cobaye offrait un milieu exceptionnellement favorable à la réussite des homogreffes de glandes endocrines (M. Aron, 1955). De nouvelles expériences ont révélé que l'homogreffe est réalisable, d'une part, dans la gonade mâle des espèces autres que le Cobaye, tels que le Rat (Petrovic, 1955) et le Hamster (Petrovic et Kayser, 1956, 1957), d'autre part, en des sites différents tels que la thyroïde (Petrovic et M. Aron, 1957; Petrovic et Kayser, 1958;; Rebel et Marescaux, 1958), l'ovaire (Petrovic et Lavillaureix, 1958, 1959), le thymus (Kuhlmann, 1960) et la chambre antérieure de l'œil (Petrovic, 1961).

Au cours de ces premières expériences d'homogreffe de préhypophyse, faites chez le Cobaye entier, on put constater que le transplant conservait une activité hormonale décelable dans les conditions de contact direct entre les parenchymes sécréteur et effecteur. Pour connaître le degré d'autonomie fonctionnelle de la préhypophyse vis-à-vis des centres nerveux hypothalamiques, M. Aron et nous-même (Petrovic et M. Aron, 1958, M. Aron et Petrovic, 1959, 1960) avons eu recours à deux procédés dont les résultats se recoupent et se complètent. Ces procédés sont, d'une part, la greffe intratesticulaire de préhypophyse suivie d'hypophysectomie totale, d'autre part, l'hypophysectomie partielle visant à laisser, dans la selle turcique, un reste de *pars distalis,* demeuré ou non, selon les cas, en connexion anatomique avec l'hypothalamus.

Il ressort de ces divers types de recherches qu'un fragment de préhypophyse, « déconnecté » par rapport à l'hypothalamus, conserve un fonctionnement hormonogène « de base ».

Les activités thyréotrope et corticotrope sont extrêmement diminuées, dans les deux sexes.

En ce qui concerne la fonction gonadotrope, une différence apparaît entre les deux sexes : chez le mâle, la gonadostimulation est suffisante pour assurer totalement ou significativement le maintien structural de la lignée séminale, sinon celui de la glande interstitielle; chez la femelle, l'activité gonadotrope est affaiblie au point que toute manifestation cyclique de l'ovaire se trouve pratiquement abolie.

*

Il ressort de ces recherches que la préhypophyse de Cobaye dont les relations avec l'hypothalamus ont été profondément modifiées, conserve une activité fonctionnelle, faible mais décelable. Ainsi s'est imposée l'idée d'étudier l'évolution morphologique et fonctionnelle de la préhypophyse soustraite à l'action de l'organisme, c'est-à-dire mise en culture *in vitro*.

2 - Avènement de la culture organotypique

La culture *in vitro* est la méthode, ou plus exactement, la discipline biologique qui se propose d'étudier la vie de la cellule, des tissus et des organes ou leurs fragments en dehors de l'organisme.

La culture dite organotypique, celle dont il sera question dans ce travail, n'a pas connu, avant ces dernières années, le même essor que les cultures cellulaires. Il est surprenant, en particulier, que l'endocrinologiste n'ait pas mis davantage à contribution cette méthode riche de promesses. Et pourtant, les travaux précurseurs en ce domaine sont, dans leurs balbutiements, une préfiguration de la culture organotypique – à une époque où rien ne laisse encore présager l'avènement des cultures cellulaires. De fait, la culture organotypique se rattache, à l'origine, bien plus à des essais de survie de jeunes embryons ou de fragments d'embryons qu'à des procédés de la culture cellulaire.

En effet, l'étude du développement de l'œuf fécondé et des stades précoces de l'embryogenèse comporte, dès la deuxième moitié du XIX^e^ siècle, des observations *in vitro*. Vulpian (1859) constate que la queue de Batraciens, séparée de l'organisme peut survivre dans de l'eau. Au cours de ses recherches sur la mécanique du développement, Roux (1885) place la partie centrale d'un embryon de Poulet dans une solution saline tiède et suit la différenciation morphologique du tube neural et du tube intestinal. Il s'agit là, indubitablement, d'une expérience de culture organotypique. Roux crée ultérieurement le terme d'explantation pour désigner le transport d'une partie de l'organisme dans un liquide de composition appropriée, ce transport ayant pour but l'étude des phénomènes de maintien, de différenciation et de régulation dans les conditions où la partie explantée est soustraite à l'influence du reste de l'organisme.

Faisant usage des milieux artificiels préconisés par Roux, Born (1897) montre que des fragments d'embryon de Batracien survivent temporairement et croissent même *in vitro* à condition que l'ectoderme puisse former une couche continue autour de l'explant. Ainsi est acquise une des données fondamentales de la culture organotypique : l'importance du recouvrement épithélial des surfaces de section.

A cette même époque sont réalisées des observations qui révèlent le pouvoir des cellules à survivre et même à se multiplier hors de l'organisme. Ainsi, L. Loeb (1902) constate que les cellules épithéliales sont capables de proliférer à la surface d'un caillot sanguin. Si l'on remplace le caillot de fibrine par des blocs d'agar ou par du sérum de bœuf

coagulé tels qu'ils servent de support de culture en bactériologie, les cellules séparées du reste de l'organisme survivent et présentent des mouvements.

De son côté, Bodon (1902) réussit à obtenir la survie des monocytes *in vitro* pendant 8 jours et Jolly (1903) celle des globules sanguins du triton pendant quelques mois. Les images de mitoses observées par Jolly indiquent que les cellules sont même aptes à se multiplier dans les conditions de la vie *in vitro*, c'est-à-dire d'effectuer les synthèses du protoplasme.

La culture organotypique en tant que méthode d'investigation biologique, a trouvé son véritable point de départ dans la célèbre expérience de R. G. Harrison (1907). Au cours de ses recherches sur la différenciation des ébauches des racines des nerfs rachidiens, cet auteur conçut un procédé expérimental permettant d'éliminer tout concours des cellules embryonnaires périphériques dans la genèse de la fibre nerveuse. Chez l'embryon de Grenouille, au stade où les neuroblastes sont encore dépourvus de prolongements cytoplasmiques, il découpe de petits fragments de moëlle épinière et les inclut dans un coagulum formé par de la lymphe de Grenouille adulte. Harrison assiste, dans ces conditions, à la formation de prolongements cytoplasmiques qui, en s'allongeant, prennent l'aspect de la fibre nerveuse. Il peut conclure que la fibre nerveuse est histogénétiquement partie intégrante de la cellule nerveuse. Mais le véritable intérêt de l'expérience de Harrison – et ici l'auteur se reconnaît successeur de Roux et de Born – est d'avoir apporté la première pierre à un édifice qui, d'une méthode, est rapidement devenu une authentique branche de la biologie.

Un élève de Harrison, Burrows (1910), étend la méthode de culture aux tissus d'Homéothermes et, remplaçant la lymphe par du plasma sanguin, apporte une contribution essentielle à la technique de culture des tissus.

La même année, Carrel et Burrows (1910) montrent que le mode de prolifération d'un tissu dépend de sa nature, conjonctive ou épithéliale.

Carrel (1912) découvre la propriété du suc embryonnaire d'assurer la prolifération théoriquement indéfinie de cellules d'Homéothermes. La culture en série de certaines variétés cellulaires est venue enrichir la biologie d'une notion fondamentale : des cellules différenciées de Métazoaires sont potentiellement aussi immortelles que les Protozoaires !

On avait trouvé les conditions dans lesquelles les cellules des Vertébrés étaient susceptibles de survivre, de croître et de proliférer hors de l'organisme. L'étude de la vie hors de l'organisme va se faire à partir de ce moment selon deux procédés fondamentalement différents :

1) On cherchera à obtenir à partir d'un explant initial *la migration et la prolifération indéfinie d'un type cellulaire.*

L'explant initial est au bout de quelques temps éliminé par l'expérimentateur, seule la zone de croissance est conservée.

C'est cette voie qui a exercé son attrait sur le plus grand nombre de biologistes. Du point de vue où nous nous sommes placés dans ce travail, ce type de recherches est intéressant plus particulièrement dans la mesure où l'on a réussi à définir les conditions qui permettent de préserver *in vitro* les cellules hautement différenciées et d'éviter une prolifération envahissante de fibroblastes.

Il s'était avéré, en effet, qu'en culture cellulaire l'activité proliférative potentiellement indéfinie apparaît incompatible avec un haut degré de différenciation. Il convient cependant de nuancer cette conclusion. L'on sait qu'une cellule en division perd certains attributs de différenciation morphologique, mais non ses caractères spécifiques. Il semble en être de même *in vitro*. Ainsi K. W. Thomson et ses collaborateurs (1959) observent la production d'hormones dans les conditions de la culture en série de cellules provenant de la préhypophyse humaine.

2) On cherchera à maintenir en vie *l'explant initial* et même à lui *conserver les caractères cytologiques, histologiques et anatomo-microscopiques de l'organe d'origine.* Ici, on s'efforce à éviter la migration cellulaire et la formation d'une zone de croissance.

Rares étaient les biologistes ayant choisi cette voie.

Thomson et ses collaborateurs (1914) opposent la croissance « coordonnée », où un fragment d'embryon continue à s'accroître comme un ensemble organisé, à la croissance « incoordonnée » des cultures cellulaires. L'étude *in vitro* des orteils de l'embryon de Poulet leur permet d'arriver à la conclusion suivante : la lésion, lors des manipulations des membranes basales entraîne l'émigration et la multiplication cellulaires, phénomène qui est préjudiciable à la croissance normale de l'explant.

Chlopin (1922) montre que la différenciation de fragments d'embryon peut se poursuivre en culture *in vitro*.

A. Fischer (1922), en cultivant des fragments d'intestin de l'embryon de Poulet de façon que l'épithélium finisse par recouvrir tout l'explant, constate également que dans ces conditions, la migration cellulaire fait défaut.

Maximow (1925) fait des observations qui plaident dans le même sens. L'explant s'arrondit et s'entoure entièrement d'une membrane épithéliale. A propos des modalités de culture *in vitro* et en faisant usage de termes qui deviendront classiques, cet auteur distingue : une culture *organotypique* au cours de laquelle se manifeste la tendance des tissus organisés à réaliser des individualités complexes à croissance interstitielle; une culture *histotypique* où les cellules prolifèrent mais de façon à conserver quelques traits propres au tissu d'origine et une culture *cytotypique* caractérisée par une prolifération cellulaire allant de pair avec la disparition des attributs morphologiques spécifiques.

Avec les travaux de Fell (1928), Fell et Robison (1929) et de P. J. Gaillard (1932, 1935, 1937, 1942) s'ouvre une nouvelle ère dans l'histoire de la culture organotypique. Leurs recherches visent d'abord à

préciser les conditions et les possibilités de cette méthode en embryologie et en endocrinologie expérimentales. Le rôle de la composition du milieu nutritif en général et du jus embryonnaire en particulier est minutieusement exploré. La nécessité et les moyens d'éviter la migration et la prolifération désordonnée des cellules sont bien mis en lumière. L'importance que peut revêtir l'édification d'une « membrane » vivante généralement unicellulaire, phénomène auquel GAILLARD (1948) donne le nom d'« encapsulation », est soulignée une nouvelle fois par J. J. P. ZAAIJER (1958) au cours de ses recherches sur le développement *in vitro* d'ébauches osseuses des membres de l'embryon humain.

C'est P. J. GAILLARD qui inaugure la méthode de l'association des organes *in vitro*. Il montre qu'un explant préhypophysaire stimule la prolifération des fibroblastes (1937); qu'en présence de la posthypophyse se différencie, à partir de la préhypophyse, un tissu évoquant le lobe intermédiaire (1938) et que, dans les conditions de la culture combinée avec le testicule, la préhypophyse de Rat manifeste une activité gonadotrope (GAILLARD et VAROSSIEAU, 1942). Cette dernière expérience marque l'introduction d'un nouveau moyen d'investigation en endocrinologie expérimentale et ouvre une nouvelle voie à la culture organotypique.

La méthode de la culture des organes en association est reprise par WOLFF et WENIGER (1953, 1954) dont les recherches ont pour but de déceler les affinités et les réactions de deux organes qui ne s'affrontent pas *in vivo*. Ainsi ont été associées en culture organotypique les gonades provenant de Souris et de Canard. Les deux explants forment des territoires distincts, ce qui permet à WOLFF (1954) de parler de l'association en « chimères ».

Le terme de Chimère — nom de cet être fabuleux de la mythologie grecque, moitié lion, moitié chèvre, muni d'une queue de dragon — est introduit en biologie par le botaniste H. WINKLER (1907). L'on sait que dans le monde vivant aucun organisme n'est constitué moitié d'une espèce, moitié d'une autre espèce. Les caractères de chacun des parents se manifestent dans la progéniture sous la forme d'un mélange. Ayant découvert une exception où les caractères morphologiques de la feuille de chacun des progéniteurs apparaissent non-mélangés, séparés par une limite anatomique nette, H. WINKLER (1907) choisit, pour désigner ce phénomène, le nom de chimère.

L'association en culture organotypique de deux ou plusieurs organes est encore utilisée par GUILLEMIN (1956), MOSZKOWSKA (1956), TIXIER-VIDAL (1958), MARTINOVITCH (1961), SCHABERG (1961), ainsi que nous-même (1960 b; 1961).

La méthode des associations *in vitro* est appelée à s'étendre à d'autres domaines de la biologie. Ainsi, tout récemment encore, CHARLIER (1961) a envisagé les perspectives qu'offre la culture organotypique dans l'étude des corrélations entre le germe dentaire et son environnement.

Petit à petit, les techniques de culture organotypique se diversifient. A dire vrai, il ne s'agit dans la plupart des cas que de retouches de détail. Le plasma, le sérum et les extraits embryonnaires restent à la base

de toutes ces techniques. Dans la technique de Martinovitch (1953), l'explant repose sur de très fines baguettes de verre entrecroisées à la surface du coagulum plasmatique. Gautheret (1933) gélifie le milieu de culture par l'adjonction de l'agar-agar. Ce même principe est mis en œuvre par Wolff et Haffen (1952) et s'est révélé très fructueux en culture d'organes embryonnaires. La supériorité du milieu gélosé dont on sait depuis Ingebrightsen (1912) qu'il est défavorable à la migration cellulaire, réside en particulier dans la constance de ses propriétés physiques et physico-chimiques.

Cependant, les progrès réalisés en biochimie de la nutrition permettent, depuis quelques années, de remplacer progressivement les milieux de cultures naturels par des milieux synthétiques (Vogelaar et Ehrlichmen, 1933; Baker, 1936; White, 1946; Fischer et coll., 1948; Morgen, Morton et Parker, 1950; Melnick, 1955; Eagle, 1955).

Il devient ainsi possible d'entreprendre l'analyse systématique des besoins nutritifs dans les conditions de la culture *in vitro*. Jusqu'à présent, ces recherches ont visé essentiellement la prolifération cellulaire, c'est-à-dire que les besoins nutritifs sont étudiés en des conditions analogues à celles mises en œuvre en bactériologie : en d'autres termes, on a eu recours aux cultures cellulaires et il convient même d'ajouter qu'il ne s'est pas agi de cellules hautement différenciées.

E. Wolff et son Ecole (1961), dans une série de recherches sur les besoins nutritifs des organes embryonnaires *in vitro*, étendent l'emploi des milieux synthétiques en culture organotypique.

En confectionnant un milieu entièrement synthétique, Trowell (1959) a réussi à maintenir en survie, pendant 6 à 9 jours, les organes ou des fragments d'organes provenant d'animaux adultes. Ce procédé se prête à des expériences *in vitro* de courte durée portant sur les organes les plus divers, parmi lesquels nous citerons la préhypophyse, la thyroïde, la parathyroïde, la glande pinéale, l'ovaire, l'utérus, la glande mammaire, la prostate et la vésicule séminale.

Nous-même avons fait usage (Petrovic et Lavillaureix, 1957) de la technique des tubes tournants, dont l'emploi s'est avéré très commode en culture de la préhypophyse. En effet, l'absence de caillot plasmatique, d'extrait embryonnaire, de gélose, etc., facilite l'étude biologique et biochimique du milieu de culture.

Cependant, cette technique présente deux inconvénients majeurs : premièrement, elle ne se prête pas à la culture prolongée des organes dont le fonctionnement exige une bonne oxygénation, comme par exemple la thyroïde, la rate, l'encéphale, le myocarde, etc. Deuxièmement, l'existence d'une surface solide favorise l'émigration cellulaire – phénomène défavorable à une culture organotypique pure.

Aussi avons-nous réalisé, avec A. Heusner (1961), un dispositif qui permet d'obvier à ces inconvénients : l'explant est cultivé en « immersion – suspension » dans un milieu liquide continuellement oxygéné. On fait passer, dans le liquide de culture, de l'oxygène produit par électrolyse et du gaz carbonique. De cette façon, la pression partielle d'oxy-

gène dans le milieu de culture est élevée; en même temps, les bulles d'oxygène empêchant l'explant de s'accoler contre la paroi du récipient de culture, ce qui favorise une culture *purement* organotypique. De plus, cette technique, en se prêtant à la culture d'explants plus volumineux que par les méthodes habituelles, permet – lorsqu'il s'agit d'animaux de petite taille – d'étudier un organe entier. Enfin, notre technique, grâce au milieu de culture *liquide,* assure de meilleurs échanges : les échanges d'oxygène et de gaz carbonique, de même que la nutrition et l'élimination des déchets s'effectuent par toute la surface de l'explant. Lorsqu'il s'agit de mettre en culture des organes très sensibles à l'anoxie, on a intérêt à faire séjourner l'animal dans une atmosphère d'oxygène à 95% avant de procéder aux manipulations de prélèvement.

3 - Culture organotypique de la préhypophyse

L'avènement de la culture organotypique et son application à des fins d'études endocriniennes a été le point de départ de diverses recherches. Moyen d'étude élégant, sans nul doute, mais aussi chemin plein d'embûches. Mais ce n'est pas le lieu ici de discourir sur les princips fondamentaux de la méthodologie scientifique. Nous nous proposons simplement de rappeler, au cours des lignes qui vont suivre, les données essentielles sur la culture organotypique de la préhypophyse.

Les premières tentatives d'explantation de la préhypophyse ne méritent qu'une courte mention. Il ne s'agit là guère de la culture organotypique à proprement parler, car elles visent davantage la zone de croissance que l'explant d'origine.

Kasahara (1935) constate que les cellules préhypophysaires perdent rapidement *in vitro* les attributs morphologiques de leur différenciation spécifique.

Anderson et Haymaker (1935) et Engel et Werber (1937) n'ont pu mettre en évidence, dans le liquide de culture, l'hormone gonadotrope éventuellement sécrétée *in vitro* par la préhypophyse de Souris.

Ce n'est qu'avec les travaux de Gaillard (1938, 1939) que commence la véritable étude de la préhypophyse en culture organotypique. Cet auteur établit un certain nombre de données fondamentales : cultivée sur un coagulum mou obtenu à partir du plasma homologue d'animal adulte, la *pars distalis* de Lapins âgés de 3 mois conserve pendant quelques semaines ses caractères anatomo-microscopiques. Une membrane unicellulaire s'édifie autour de l'explant. Les cellules perdent leurs granulations chromophiles. Elles conservent néanmoins une sécrétion hormonale attestée par le pouvoir de stimuler la croissance de fibroblastes *in vitro.* Un certain nombre d'arguments plaident en faveur de la sécrétion de l'hormone somatotrope.

Gaillard (1954, 1955) et sa collaboratrice Bakker-Sauer (1961) étudient également la fonction thyréotrope et Schaberg (1961) la fonction corticotrope. Nous reviendrons sur leurs résultats qui sont en faveur

d'une conservation partielle de l'activité hormonale de la préhypophyse en culture organotypique.

Des divergences d'opinion ne tardent cependant pas à apparaître.

Dans une série de recherches, Martinovitch, seul ou en collaboration avec Radivojevitch ou Pavic (1954, 1955, 1960, 1961) réussit à maintenir en vie la préhypophyse de jeunes rats pendant 3 mois et plus. Dans ses récentes publications, cet auteur (1961) fait état de ses nouveaux résultats qui montrent, selon lui, qu'un explant préhypophysaire conserve, si la culture est réalisée suivant sa technique, des granulations chromophiles pendant de nombreuses semaines. Nous aurons à revenir dans la suite de cet exposé sur les recherches de Martinovitch dont certains résultats indiquent, également, la conservation *in vitro* des activités corticotrope et thyréotrope.

En explantant la préhypophyse de Chien et de Rat, Guillemin et ses collaborateurs (1956, 1959, 1960, 1961) constatent, en s'aidant de l'examen du liquide d'incubation, que la production de l'hormone adrénocorticotrope diminue *in vitro* au point de ne plus être décelable après quelques jours de culture. L'adjonction de l'hypothalamus, sous forme de fragments tissulaires ou d'extrait aqueux ou salin, est suivie de la réapparition dans le liquide de culture d'une substance à activité corticotrope. Guillemin (1956) interprète ce résultat comme étant l'expression d'activité humorale hypophysiotrope spécifique de l'hypothalamus. Guillemin et ses collaborateurs ont montré, de plus, que le médiateur chimique responsable de cette activité est différent de la vasopressine, de l'ocytocine, de l'adrénaline, de la noradrénaline, de l'acétylcholine, de l'histamine et de la hydroxy-5-tryptamine.

Dans une nouvelle série de recherches, Guillemin et ses collaborateurs (1960, 1961) ont cherché à isoler et à purifier par la chromatographie et l'électrophorèse la substance d'origine hypothalamique responsable de la libération de l'hormone adrénocorticotrope par la *pars distalis*. Cette substance, appelée par Saffran, Schally et Benfey (1955) le « corticotrophin-releasing-factor » ou C.R.F. est une molécule peptidique dont la composition chimique voisine de la vasopressine est de nature à expliquer la similitude de certains effets produits par ces deux hormones.

Bref, grâce à la culture de la *pars distalis*, Guillemin et son équipe ont été en mesure d'apporter ce qui faisait encore défaut à la théorie de Harris (1949, 1952, 1956) sur le mécanisme du contrôle de la fonction préhypophysaire par les centres nerveux : la preuve de l'existence d'une substance de source hypothalamique capable à des doses infinitésimales de susciter la libération de l'hormone corticotrope.

Pour terminer cette analyse, nous voulons évoquer deux auteurs dont les recherches offrent des aspects communs avec les nôtres.

Moszkowska (1956) cultive, par la technique de Wolff et Haffen, la préhypophyse embryonnaire de Poulet en association avec le testicule, en vue d'une étude de son activité gonadotrope.

Les résultats de ces recherches montrent que l'hypophyse embryon-

naire mise en culture est capable d'excréter des hormones gonadotropes. L'épiphyse embryonnaire a, *in vitro,* des effets inhibiteurs sur la sécrétion des gonadostimulines. Il n'a pas été possible de déceler une éventuelle action de l'hypothalamus dans ces conditions expérimentales.

L'étude de la préhypophyse du Rat mâle incubée pendant 3 heures 30 dans le liquide de Krebs-Ringer permet à Moszkowska (1961) de conclure à l'excrétion *in vitro* d'une quantité appréciable de l'hormone de stimulation folliculaire (FSH) et, en présence de tissu hypothalamique, de l'hormone de lutéinisation (LH).

Dans le cadre d'une recherche sur les relations entre l'hypophyse et la thyroïde chez l'embryon de Poulet, Tixier-Vidal (1958) montre qu'*in vitro,* la fonction thyréotrope est capable d'autodifférenciation.

D'autres observations furent réalisées, nous en ferons état chemin faisant.

IV - MÉTHODES EXPÉRIMENTALES

1 - Matériel biologique

L'animal qui a servi à l'ensemble de nos expériences a été le Cobaye. Nous avons encore utilisé pour certaines modalités expérimentales, le Hamster ordinaire *(Cricetus cricetus),* le Rat, le fœtus humain et l'embryon de Poulet de la race « Leghorn blanche ». Les œufs de Poulet ont été incubés dans une couveuse réglée à 38°C. Nous avons choisi le moment du prélèvement de l'embryon en fonction de la durée de l'incubation, mais nous avons contrôlé son âge en nous référant aux normes définies par Hamburger et Hamilton (1951).

2 - Techniques expérimentales

a) CULTURE ORGANOTYPIQUE

1) *Préparation de l'explant.* – Nous sacrifions l'animal en lui ouvrant rapidement la cage thoracique et le cœur. Ce procédé permet de prélever les organes dont les vaisseaux sont en grande partie vidés de leur contenu. De cette façon, on évite l'apparition des produits de dégradation de l'hémoglobine dont l'accumulation serait préjudiciable à la réussite d'une culture. Dès son prélèvement, l'organe à cultiver est découpé, à l'aide d'un scalpel à iridectomie, en fragments cubiques de 0,5 à 1 mm de côté.

Les opérations de culture sont effectuées rapidement, sous la loupe binoculaire, dans la solution servant de milieu nutritif. Le séjour dans une solution saline, même parfaitement équilibrée, nous a paru de na-

ture à compromettre les chances de survie des explants. Les fragments sont mis en culture suivant les procédés que nous décrirons après avoir pris connaissance de la nature des milieux nutritifs.

2) *Nature des milieux nutritifs.* – Trouver les conditions de milieu appropriées à la culture organotypique des divers organes est un problème dont la solution demeure malaisée. Les milieux de culture qui ne reposent pas sur l'emploi de jus embryonnaire, dérivent plus ou moins directement du sang circulant.

En effet, on utilise soit le plasma ou le sérum, soit un liquide d'ascite. Les deux premiers sont d'un emploi plus commode, mais un liquide d'ascite, qui correspond pratiquement à un ultrafiltrat plasmatique, ressemble davantage aux liquides interstitiels, – véritable milieu intérieur des cellules *in vivo*.

Nous allons maintenant définir les caractères des milieux nutritifs que nous avons utilisés.

Milieu semi-synthétique. – Nous avons essayé plusieurs milieux synthétiques, dont aucun ne s'est prêté, à l'état pur, à une culture organotypique prolongée de la préhypophyse de Cobaye adulte. Aussi étions-nous obligé de recourir à l'emploi d'un milieu semi-synthétique.

Des essais préliminaires nous ont amené à donner notre préférence à un milieu préconisé par Lepine et ses collaborateurs (1956), qui comporte une solution synthétique à raison de 90% et de sérum à 10%.

La solution synthétique comporte la solution saline de Hanks, un hydrolysat enzymatique et acide de caséine et de lactalbumine, enrichi de glutamine et de cystéine et des vitamines hydrosolubles.

Nous avons préparé la solution synthétique selon la formule suivante :

Pour 1 litre de solution saline de Hanks, renfermant 0,1% de glucose, on ajoute :

Hydrolysat de caséine et de lactalbumine	0,50 g
Glutamine	0,15 g
Cystéine-L	0,01 g
Acide ascorbique-L	0,05 g
Solution N° 1	1,00 ml
Solution N° 2	1,00 ml
Solution N° 3	10,00 ml

– Solution N° 1

niacinamide	0,1 g
pyridoxine	0,1 g
thiamine	0,1 g
pantothénate de Ca	0,1 g
acide para-amino-benzoique	0,1 g
choline	0,1 g
riboflavine	0,01 g

pour 100 ml d'eau bidistillée

– Solution N° 2
acide folique 0,1 g
pour 100 ml d'une solution à 2% de bicarbonate de Na

– Solution N° 3
biotine 0,01 g
pour 100 ml d'eau bidistillée.

Quant au sérum il s'agissait soit du sérum de Poulain, soit du sérum de Cobaye. Dans ce dernier cas, le sérum provenait d'un animal normal ou bien d'un animal ayant subi 10 jours auparavant l'hypophysectomie totale et dont les effecteurs des hormones préhypophysaires montrent au bout de ce délai, le tableau d'involution caractéristique.

Le milieu à base de sérum de Cobaye hypophysectomisé ne contient pas d'hormones préhypophysaires. Il convient donc mieux aux recherches sur les propriétés fonctionnelles de la préhypophyse en culture organotypique. Mais ce n'est pas un milieu *anhormonal*. Il renferme théoriquement les hormones qui se trouvent normalement dans le sang circulant et aussi les éventuels principes sériques d'origine hypothalamiques. Nous devons en tenir compte dans l'interprétation des résultats, bien que, en raison de la forte dilution, les quantités mises en œuvre soient minimes.

Le milieu semi-synthétique s'est révélé un milieu de choix pour la culture organotypique de la préhypophyse adulte. Cependant, afin d'être en mesure de comparer nos résultats à ceux des autres auteurs, nous avons additionné le milieu semi-synthétique d'un extrait embryonnaire. Nous avons varié soit l'âge des embryons servant à la préparation de l'extrait, soit les proportions de l'extrait entrant dans la composition du milieu de culture. L'extrait était préparé à partir du seul encéphale, dont on avait pris le soin d'éliminer la région hypothalamique.

Nous utilisons le milieu semi-synthétique de deux manières. D'une part, nous l'introduisons simplement dans le tube renfermant les explants à cultiver par la méthode classique des tubes tournants (Gey, 1933) : c'est le procédé de culture N° 1. D'autre part, en vue de créer un support de culture *semi*-solide et en nous inspirant des travaux de Wolff et Haffen (1952), nous mélangeons le liquide nutritif avec de la gélose : c'est le procédé de culture N° 2.

Milieu dit anhormonal. – Il s'agit ici d'un milieu préconisé par Wolff et Haffen (1952) et dont la composition est la suivante :

– gélose noble Difco à 1% préparée dans liquide de GEY . . 9 gouttes
– solution saline de TYRODE . . . . . 4 gouttes
– extrait d'embryon de Poulet de 7 jours . . . . . 4 gouttes

Nous ajoutons par ml de la solution de TYRODE environ 100 unités d'un sel sodique de la pénicilline G cristallisée.

Le liquide de TYRODE peut être remplacé par la solution synthétique décrite au paragraphe précédent. Cette variante du milieu anhormonal a été utilisée avec profit dans les expériences de culture du testicule embryonnaire du Poulet.

3) *Procédés de culture.* – Quel que soit le milieu nutritif, nous nous en servons, en vue de la culture, de deux manières différentes.

Procédé N° 1 – Culture en tubes tournants.

Plusieurs explants sont disposés directement contre la surface intérieure du tube. Celui-ci, soigneusement bouché, est introduit dans un tambour rotatif placé dans une étuve et tournant à raison de 8 révolutions par heure. Au bout d'une heure, on ajoute le liquide nutritif, que l'on renouvelle le lendemain, puis tous les 3 jours.

Procédé N° 2 – Culture sur le mélange gélose-milieu nutritif.

On prépare au fond d'une « salière » un milieu constitué par le mélange de quantités égales de gélose noble Difco à 1% et de milieu nutritif. On dispose sur la surface de cette masse semi-solide 4 explants, puis on introduit le récipient de culture, hermétiquement fermé dans l'étuve à température constante. Tous les 3 jours, les explants sont détachés avec précaution et, après lavage dans le liquide nutritif, transportés sur un milieu frais.

b) TRANSPLANTATION

L'explant à transplanter est introduit à l'aide d'un fin trocart dans l'un des organes-pairs : testicule, ovaire, thyroïde.

Dans chaque expérience, l'organe controlatéral nous a servi de témoin, ce qui nous a permis de faire une comparaison entre les éventuelles influences hormonales *in situ* des explants greffés, à l'exclusion d'une action de relais.

Nous n'insisterons pas sur les détails de cette technique décrite en de nombreuses publications antérieures (Petrovic, Weill et Deminatti, 1953a, 1953b; Petrovic, 1954; M. Aron, 1955; Petrovic et Aron, 1957; Petrovic et Lavillaureix, 1958; Aron et Petrovic, 1959, 1960).

c) HYPOPHYSECTOMIE

Nous avons pratiqué l'hypophysectomie selon la technique classique de P. Smith (1926) telle que M. Aron l'a adaptée au Cobaye (voir à ce sujet : Aron et Petrovic, 1959).

3 - Techniques d'observation

a) ÉTUDE DE CELLULES VIVANTES

L'évolution des explants peut être suivie grâce à l'examen quotidien au microscope à contraste de phase.

Pour examiner les cellules de *pars distalis* nous avons eu recours au procédé d'empreintes utilisé par Corin et Frederic (1960) dans une recherche sur la différenciation de l'hypophyse embryonnaire de Poulet.

L'explant préhypophysaire est coupé en deux et la tranche de section est appuyée contre une lame porte-objet. On dépose alors à cet endroit une goutte de liquide nutritif et, de part et d'autre, deux gouttes d'une paraffine liquéfiée par chauffage. On pose dessus une lamelle. Dans ces conditions, les cellules ne seront pas écrasées et pourront être examinées au microscope à contraste de phase.

b) TECHNIQUES HISTOLOGIQUES

Il s'agit ici de techniques couramment utilisées à l'heure actuelle et dont nous jugeons superflu de donner une description détaillée. Nous ne ferons donc que de les mentionner.

1) *Fixation.* – Les explants sont fixés au Bouin-Hollande additionné de 10% d'une solution saturée de sublimé, selon la formule de Herlant (1950). La durée de fixation est de 24 heures.

Les explants destinés à être colorés par le vert de méthyle-pyronine sont fixés au liquide de Carnoy (sans chloroforme).

2) *Colorations histologiques.* – Nous avons utilisé les techniques de coloration suivantes :

- la coloration à l'hématoxyline-éosine
- la coloration de Cleveland-Wolfe, modifiée par Herlant (1956)
- la coloration trichromique de Heidenhain à l'azocarmin
- la coloration trichromique d'Ignesti.

3) *Réactions histochimiques.* – Ces techniques qui ont visé plus particulièrement la mise en évidence des divers types cellulaires de la préhypophyse, ont été appliquées dans les conditions préconisées par Herlant (1956, 1958, 1961), Herlant et Pasteels (1959), Racadot (1959) et Herlant et Grignon (1961).

La coloration au PAS est associée à l'orange G. L'aldéhyde-fuchsine est préparée suivant la méthode de Gomori. La coloration est précédée d'une oxydation au permanganate-sulfurique. Le bleu Alcian est utilisé en solution à pH 0,2.

Pour la mise en évidence des ribonucléoprotéines, nous utilisons la

technique de coloration au vert de méthyle-pyronine, telle qu'elle a été mise en œuvre par Deminatti (1959) dans une recherche cytochimique sur la teneur en acide ribonucléique des différents types cellulaires de la préhypophyse.

c) MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE

Contrairement aux techniques histologiques et histochimiques dont les conditions d'application sont pour ainsi dire codifiées, l'emploi de la microscopie électronique appelle quelques commentaires.

L'évolution d'une discipline scientifique est liée au développement des techniques et l'on connaît l'essor qu'a pris l'étude de la cellule avec l'avènement de la microscopie électronique.

Le haut pouvoir de résolution du microscope électronique permet d'aborder le problème de l'ultrastructure de la cellule de façon directe Certes, les images obtenues jusqu'à présent sont dans une certaine mesure des artefacts. L'on sait, par exemple, que l'acide osmique fixe préférentiellement les lipoprotéines et que la déshydratation est incompatible avec l'intégrité structurale à l'échelle moléculaire. Il reste néanmoins vrai que la microscopie électronique est devenue la source d'informations indispensable à toute étude des structures cellulaires.

La naissance de la technique des coupes ultrafines, vers 1953, a marqué un tournant dans l'histoire des applications biologiques de la microscopie électronique. Les divers organites cellulaires furent définitivement identifiés, leurs caractères ultrastructuraux minutieusement décrits (Palade, 1953, 1955, 1956; Bernhard et coll., 1954; Haguenau et Bernhard, 1955; Bernhard et Rouiller, 1956; Dalton et Felix, 1956; Palade et Siekevitz, 1956; Haguenau, 1958; Baud, 1959; Palay, 1958; Porter, 1960). Dans cette nouvelle cytologie, les caractères de forme et de fonction tendent à s'amalgamer chaque jour davantage.

Les cellules glandulaires sont un objet de choix en microscopie électronique. Il s'est trouvé, en effet, que le processus secrétoire s'accompagne d'importantes modifications à l'échelle des ultrastructures cytoplasmiques. De ce fait, le microscope électronique s'est révélé un outil précieux dans les investigations portant sur les glandes endocrines. Nos recherches en culture organotypique en seront une nouvelle démonstration.

Nous avons employé les techniques de microscopie électronique suivantes : les explants sont fixés à l'acide osmique à 1%, tamponné selon Palade (1952) à pH 7, 4-7, 8. La fixation se fait à 4°C. Sa durée est de 30 minutes à une heure, selon la taille de l'explant. Aucune manipulation n'étant nécessaire avant de verser le fixateur sur l'explant, nous pouvons dire qu'il s'agit d'une véritable « fixation *in vivo* ». Les pièces fixées sont lavées très rapidement à l'eau distillée, puis déshydratées par l'alcool et incluses au méthacrylate de butyle-méthyle. La polymérisation se fait à 60° C, avec le peroxyde de benzoyle

comme catalyseur. Pour les organes embryonnaires, nous avons eu recours au procédé de prépolymérisation, préconisé par Borysko (1956).

Les coupes ultra-fines sont faites au microtome Servall, de Porter et Bloom. On ne retient que les coupes de teinte blanc-argent, dont l'épaisseur est de l'ordre de 300 Å.

Les microphotographies sont réalisées au microscope électronique Philips E. M. 100.

La sélection des coupes les plus intéressantes est faite par l'examen des coupes semi-fines montées à la glycérine et examinées en contraste de phase. L'étude et l'interprétation des images au microscope électronique est facilitée par un examen au microscope optique de coupes semi-fines, précédant ou suivant immédiatement une coupe ultra-fine.

Pour établir les corrélations plus précises entre les données de la microscopie électronique et celles de la microscopie optique, nous avons utilisé les procédés de coloration préconisés par De Harven (1956). Le méthacrylate est dissous par le chloroforme ou par le benzène. La coupe est ensuite oxydée à l'acide périodique et colorée à l'hématoxyline-éosine, au PAS ou au bleu de toluidine.

La fixation au liquide de Palade, aussi remarquable soit-elle pour la conservation des ultrastructures, ne se prête guère à l'ensemble des colorations utilisées en cytologie préhypophysaire. Aussi avons-nous dû renoncer à réaliser une superposition complète entre les résultats obtenus au microscope électronique et ceux acquis au microscope optique.

d) INCORPORATION DU RADIOIODE

L'étude de l'incorporation par l'explant thyroïdien du radioiode a comporté la mesure de sa radioactivité après 16 heures de culture, d'une part, et l'évaluation quantitative des produits organiques des synthèses iodées dans l'hydrolysat thyroïdien, d'autre part.

L'explant thyroïdien est cultivé pendant 16 heures sur le milieu anhormonal renfermant une dose traceuse de ^{131}I (1 µc par ml de milieu nutritif et par salière).

A la fin de l'expérience, l'explant thyroïdien (séparé le cas échéant de l'explant préhypophysaire associé) est introduit dans le compteur de Geiger où sa radioactivité est mesurée directement pendant 5 minutes. Des expériences de contrôle nous ont permis de constater que les erreurs dues à l'auto-absorption sont négligeables en raison du très faible volume de l'explant.

Nous avons retenu le chiffre obtenu par la mesure de 5 minutes. Notre étude a visé à comparer simplement la fixation du radioiode par des explants thyroïdiens, au même stade ontogénétique et cultivés dans les mêmes conditions expérimentales, la seule variable étant représentée par la nature de l'organe associé. D'autre part, en raison de

la petitesse d'un explant thyroïdien, il eut été illusoire de vouloir rapporter la radio-activité à une unité de volume.

Après la mesure au compteur de Geiger, les explants thyroïdiens d'une catégorie expérimentale sont groupés et soumis à l'étude radiochromatographique suivant le procédé de Roche et ses collaborateurs (1953) tel qu'il est utilisé par Geloso (1956) : hydrolyse trypsique, suivie de chromatographie unidimensionnelle, en butanol ammoniacal et en butanol acétique.

Nous avons fait l'analyse quantitative des deux radiochromatogrammes au compteur de Geiger et avons exprimé les résultats en pourcentage de l'activité totale d'un radiochromatogramme. Comme il est d'usage, nous avons évalué la thyroxine à partir du chromatogramme en butanol ammoniacal, et les iodotyrosines à partir du chromatogramme en butanol acétique.

V - RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

1 - Caractères morphologiques d'explants préhypophysaires en culture organotypique

Nous avons cultivé un très grand nombre de préhypophyses prélevées chez le Cobaye, le Rat et le Hamster. Leur évolution générale fut toujours sensiblement la même. Nous prendrons pour type de description la préhypophyse de Cobaye ayant fait beaucoup plus appel à cette espèce qu'aux autres.

Les résultats n'ont pas varié en fonction du sexe de l'animal donneur. Quant à l'âge, nous avons cultivé avec le même succès les préhypophyses de Cobayes nouveau-nés et d'animaux adultes de 300 à 400 g.

Le liquide semi-synthétique s'est révélé particulièrement propice à la culture organotypique de la préhypophyse d'animaux adultes. Aussi l'avons-nous adopté comme le milieu nutritif de base. Précisons encore que si dans nos essais préliminaires le sérum provenait d'animaux normaux (Poulain, Cobaye), les expériences définitives furent effectuées avec le sérum des Cobayes hypophysectomisés depuis 10 jours au moins.

Nous verrons qu'un milieu nutritif exclusivement à base de jeunes embryons de Poulet n'est pas propice à une culture organotypique prolongée de la préhypophyse d'animal adulte. Or, il s'agit là d'un milieu que nous avons été amené à utiliser dans nos expériences d'association de courte durée entre la préhypophyse et la thyroïde ou le testicule de l'embryon de Poulet. Aussi avons-nous jugé opportun de faire une étude de l'évolution cytologique de la préhypophyse sur le milieu anhormonal.

Les auteurs qui ont été conduits à cultiver la préhypophyse *in vitro* et parmi lesquels nous citerons Gaillard (1938, 1939), Martinovitch

(1954) et Guillemin (1956), Schaberg (1961) et Pasteels et Mulnard (1961) ont toujours fait usage de milieux nutritifs comportant sous une forme ou une autre de l'extrait embryonnaire. Aussi avons-nous estimé indispensable de compléter nos résultats obtenus en milieu semi-synthétique, par des expériences en milieu semi-synthétique additionné d'un extrait embryonnaire.

Des fragments préhypophysaires de Cobaye adulte ont été cultivés de 1 à 60 jours. Ils ont été examinés par les diverses techniques que nous avons énumérées au chapitre précédent.

L'explant préhypophysaire offre en milieu semi-synthétique une évolution toujours identique quant aux cellules constitutives de l'explant initial. Seules les cellules les plus périphériques se comportent différemment selon que l'explant est cultivé selon le procédé n° 1 ou le procédé n° 2. Cette particularité nous oblige de décrire séparément les résultats de ces deux modalités de culture.

a) ÉVOLUTION D'UN EXPLANT PRÉHYPOPHYSAIRE EN MILIEU SEMI-SYNTHÉTIQUE

1) *Formation d'une « membrane ». Problème des migrations cellulaires.*

Examen direct – Procédé de culture N° 1 – En tubes tournants, dès le troisième jour de culture, l'examen direct en contraste de phase permet d'assister à l'apparition, autour de l'explant initial, de cellules en migration et en prolifération centrifuges. Dans les jours qui suivent, ce halo cellulaire s'agrandit lentement pour atteindre au bout de 4 à 6 semaines un diamètre de 3 à 5 mm. Au début, ces cellules ont une forme allongée. Mais, 2 à 3 semaines après le début de la culture, leur cytoplasme devient plus abondant, ce qui leur donne une forme polyédrique. A la même période, on remarque parfois parmi les cellules en migration la présence de volumineuses cellules arrondies, pourvues d'un gros noyau et d'un cytoplasme assez dense. Il convient de préciser encore que les cellules les plus éloignées de l'explant initial présentent toujours une forme plutôt fusiforme.

Ce phénomène de migration et prolifération cellulaires ne compromet nullement la conservation de l'explant initial.

Il s'agit donc, en tubes tournants, d'une culture mixte, organotypique et cytotypique de l'explant préhypophysaire.

Procédé de culture N° 2. – L'examen direct en contraste de phase montre l'absence d'une véritable migration et prolifération cellulaires. Les contours de l'explant initial s'arrondissent en quelques jours. Il s'agit ici d'une culture organotypique pure.

Examen histologique. – Quel que soit le procédé de culture, l'explant préhypophysaire de Cobaye s'entoure en moins de 24 heures, sur toute sa surface restée libre, d'une « membrane » unicellulaire néoformée.

Cette « membrane » résulte d'une organisation de cellules glandu-

laires situées à la périphérie de l'explant : les phénomènes de glissement et d'étalement cellulaires vont de pair avec la multiplication qui est attestée par les images de mitose. L'existence d'une surface de section nette représente un substrat qui, indiscutablement, favorise l'édification d'une membrane de nature épithéliale.

Toute discussion sur la signification biologique de cette membrane dépasserait le cadre de ce travail. Nous nous bornerons à indiquer qu'il ne s'agit là que d'un aspect du phénomène de la cicatrisation épithéliale telle qu'on l'observe *in vivo* à l'occasion d'une plaie superficielle. Dans les deux cas, le glissement et la prolifération de cellules épithéliales aboutissent au recouvrement de la surface mise à nu; dans les deux cas, l'état de la surface doit être propice aux mouvements cellulaires; dans les deux cas le phénomène s'atténue avec l'âge physiologique du tissu.

Si l'explant préhypophysaire est cultivé par le procédé N° 1, un nouveau phénomène vient interférer dans les processus décrits ci-dessus, car le verre offre une surface favorable à la migration cellulaire. Nous avons vu que dès les premiers jours de culture se forme autour de l'explant initial un halo de cellules qui prolifèrent en nappe épithéliale unicellulaire.

L'identification de ces cellules qui forment la zone de migration soulève quelques difficultés. L'étude de leurs caractères morphologiques et histochimiques permet de conclure qu'il s'agit de cellules glandulaires de la préhypophyse, dont le cytoplasme montre des signes morphologiques d'une activité fonctionnelle, sans qu'il nous fut possible, jusqu'à présent, de les identifier avec précision.

Quant aux grandes cellules rondes qui apparaissent parfois dans la zone de migration 2 à 3 semaines après le début de la culture, nous pouvons affirmer qu'elles sont à tous points différentes des cellules préhypophysaires. D'ailleurs, on les retrouve également à l'intérieur de l'explant, quel que soit le procédé de culture. Dans certains cas, on assiste à leur multiplication tellement intense que l'explant initial augmente de volume à un pôle; une ligne de séparation divise alors les volumineuses cellules rondes des cellules constitutives de l'explant initial (Fig. 1). De nouvelles recherches sont nécessaires pour préciser la nature de ces grandes cellules rondes dont l'étude s'annonce dès maintenant pleine d'intérêt. Précisons encore que leur cytoplasme est très riche en structures ergastoplasmiques.

La signification biologique de la migration et de la prolifération cellulaires centrifuges est à situer dans le cadre des phénomènes de cicatrisation et de régénération propres à tous les Métazoaires quoique à des degrés divers.

*

Il ressort de cette étude que dans certaines conditions les caractères physiques et physico-chimiques du support de culture interviennent de façon directe dans les modalités évolutives d'un organe ou d'un frag-

ment d'organe mis en culture. En effet, comme la présence d'une surface solide semble conditionner la migration et la prolifération cellulaires centrifuges* son absence favorise l'évolution *purement* organotypique d'un explant.

Depuis la publication de nos premiers résultats concernant le déterminisme des modalités évolutives d'explants préhypophysaires de Cobaye (Petrovic, 1959), Wolff et Marin (1960) ont publié des observations analogues sur le rôle joué par la nature du substrat dans l'évolution soit organotypique, soit histiotypique d'un organe embryonnaire mis en culture.

La « membrane » une fois édifiée, joue-t-elle un rôle ? Nos expériences ne permettent pas de résoudre ce problème. Tout ce que nous pouvons dire, c'est que, d'une manière générale, en l'absence des phénomènes qui se traduisent par la formation d'une « membrane » et, éventuellement, par une migration et une prolifération centrifuges – l'explant préhypophysaire ne survit guère en culture.

2) *Caractères anatomo-microscopiques*

Quel que soit le procédé de culture, les cellules constitutives de l'explant préhypophysaire gardent pendant des semaines l'organisation anatomo-microscopique de l'organe d'origine. L'architecture lobulaire devient même après quelques semaines de culture plus apparente en raison d'un léger écartement des lobules entre eux.

Une restriction s'impose cependant : si les phénomènes de migration sont importants, l'architecture lobulaire tend à s'estomper et l'explant préhypophysaire perd en partie son organisation spécifique.

3) *Caractères cytologiques*

D'une manière générale, le volume des cellules préhypophysaires diminue en culture organotypique. Cette diminution de volume affecte davantage les cellules des explants de *pars distalis* cultivés par le procédé N° 1. Nous nous empressons d'ajouter que du point de vue cytologique et ultrastructural, nous n'avons pas trouvé de différences significatives entre les exemples cultivés par l'un ou l'autre de ces deux procédés. Aussi les réunirons-nous dans une description commune.

L'application des techniques de coloration usuelles en cytologie préhypophysaire nous a permis de constater une disparition de toutes les variétés des granulations chromophiles qui débute dès les premières heures de culture et devient quasi-totale au bout de 3 à 5 jours. Quelle que soit ensuite la durée de culture (jusqu'à 60 jours dans les expérien-

* Harrison (1907) et Burrows (1910) ont déjà constaté qu'un support de culture relativement solide est indispensable à la croissance cellulaire *in vitro*.

ces rapportées ici), l'explant préhypophysaire est formé de cellules d'aspect chromophobe, extrêmement pauvres en granulations chromophiles *. La présence de quelques rares grains, éparpillés dans le cytoplasme, permet, par la recherche de leurs caractères tinctoriaux et cytochimiques, l'identification de la variété cellulaire. Il nous a été ainsi possible de retrouver dans les explants de préhypophyse cultivés en milieu semi-synthétique pendant plusieurs semaines toutes les variétés de granulations chromophiles décrites dans la glande *in situ* :

1) Un premier type de granulations manifeste une très forte affinité tinctoriale pour l'Orange G (technique de Heidenhain). Elles présentent une teinte orthochromatique au bleu de toluidine. Nous avons conclu qu'il s'agit de granulations appartenant aux cellules α.

2) Un deuxième type de granulations prend une teinte bleu-violacée par la technique de Heidenhain et par celle de Cleveland-Wolfe. Les cellules qui possèdent ce type de granulations sont PAS-positives; colorées au PAS-orange G, elles prennent une teinte mauve pâle. Le bleu Alcian à pH 0,2, après l'oxydation au permanganate sulfurique, leur donne une teinte bleu-violacée. La fuchsine-paraldéhyde après l'oxydation au permanganate sulfurique les colore en mauve. L'ensemble de ces caractères tinctoriaux et histochimiques permettent de conclure qu'il s'agit dans ce cas de cellules β.

3) Un troisième type de granulations nous est apparu particulièrement intéressant du point de vue cytologique.

Colorées au PAS-Orange G, ces cellules ont une teinte sinon franchement rouge brique, du moins toujours bien différente de celle des cellules α. Aucune affinité ne se manifeste pour la fuchsine-paraldéhyde. La réaction au PAS peut être légèrement positive. Les caractères cytologiques de cette variété cellulaire posent quelques problèmes, mais nous autorisent néanmoins à conclure qu'il s'agit de cellules γ.

4) Un quatrième type de granulations présente une teinte bleu-ciel (technique de Heidenhain et celle de Cleveland-Wolfe). Ces granulations présentent une teinte métachromatique au bleu de toluidine; elles se colorent fortement au bleu Alcian à pH 0,2; elles sont PAS-positives et fuchsine-paraldéhyde-positives. L'association de l'Orange G au PAS ne modifie pratiquement pas la teinte rose-violacée que confère ce dernier. Aussi avons-nous conclu qu'il s'agit de cellules δ.

5) Un dernier type de granulations présente une affinité élective pour l'érythrosine (technique de Cleveland-Wolfe). Les cellules qui

* L'examen des cellules vivantes, en contraste de phase, selon le procédé de Corin et Frederic (1960) confirme l'absence quasi-totale de granulations cytoplasmiques dans les explants préhypophysaires cultivés depuis plus de 4 à 5 jours.

possèdent ce type de granulations sont volumineuses et présentent un gros noyau clair. On reconnaît dans le cytoplasme l'emplacement d'une zone de Golgi. Les structures pyroninophiles sont particulièrement abondantes. Il s'agit dans ce cas, indubitablement, de cellules ε.

Aussi devons-nous conclure que les divers types de cellules chromophiles reconnus dans la glande *in situ* sont tous décelables en culture organotypique.

Il convient d'ajouter encore deux remarques.

Premièrement, nous n'avons pas souvent réussi à mettre en évidence dans un explant préhypophysaire *toutes* les variétés de granulations, même si, éventuellement, elles ont été présentes. En effet, devant une cellule n'offrant que par ci ou par là quelques rares granulations, l'application des diverses techniques de coloration sur les coupes sériées – seul procédé réellement valable en cytologie préhypophysaire – se heurte à de très grandes difficultés pratiques. Après plusieurs semaines de culture, un explant préhypophysaire est constitué de cellules dont la majorité est difficile à identifier avec certitude.

Deuxièmement, la question se pose de savoir si certaines variétés cellulaires de l'explant préhypophysaire n'offrent pas en culture organotypique des particularités évolutives. En effet, ayant cultivé la préhypophyse de Rat pendant 1 à 3 semaines, Pasteels et Mulnard (1961) viennent de montrer que les cellules α, β et γ subissent une atrophie progressive, alors que les cellules ε se multiplient et s'hypertrophient de façon notable. *Dans les conditions de nos observations,* d'une part, compte tenu de la première remarque, d'autre part, l'étude d'explants préhypophysaires ne nous a pas permis de faire des constatations de même nature. Mais nous devons spécifier que si toutes les variétés cellulaires persistent, seules les cellules ε sont riches en structures ergastoplasmiques (voir plus loin).

La disparition quasi-totale des granulations chromophiles soulève la question de l'état fonctionnel d'une préhypophyse en culture organotypique. Seule une étude des propriétés fonctionnelles est de nature à donner une réponse définitive (voir : chapitre 2). Néanmoins, l'étude des ribonucléoprotéines cytoplasmiques et des caractères ultrastructuraux de la cellule préhypophysaire *in vitro,* pourra nous apporter au moins des éléments d'une réponse.

En ce qui concerne les ribonucléoprotéines, la technique de Brachet montre qu'après 4 à 7 semaines de culture, le cytoplasme de la plupart des cellules présente des structures pyroninophiles dont la colorabilité disparaît après traitement à la ribonucléase. Leur forme, quoique souvent plutôt ramassée, n'est pas très différente de celle que Deminatti (1959) a observée en appliquant la même méthode à la préhypophyse de Cobaye *in situ*. Nous estimons que cette observation concernant la persistance *in vitro* des structures pyroninophiles domine tous les résultats que nous avons recueillis en microscopie optique. En effet, elle

plaide en faveur de la conservation d'une activité synthétique des cellules préhypophysaire en culture organotypique *.

Le recours à la microscopie électronique nous a permis de préciser les caractères cytologiques d'explants préhypophysaires cultivés *in vitro* pendant quelques semaines.

L'examen de l'explant aux faibles grossissements montre que les rapports normaux entre les cellules glandulaires sont généralement bien conservés et que les images d'écartement entre les membranes cellulaires sont extrêmement rares. Seules quelques rares cellules, situées à la périphérie de l'explant, montrent la tendance à la migration. Elles prennent alors une forme nettement allongée, sans pour autant perdre leurs caractères ultrastructuraux spécifiques. Et pourtant sur la foi du microscope optique, on pourrait les assimiler aux fibroblastes. On reconnaît de petites cavités à contenu clair, délimitées par des cellules glandulaires dont les membranes forment des microvillosités. Ces cavités ne sont pas à confondre avec des espaces conjonctifs renfermant des fines fibrilles collagènes.

L'examen de l'explant à un plus fort grossissement apporte la preuve de l'absence d'altérations des ultrastructures cellulaires (Fig. 46 à 49).

De forme généralement régulière, le noyau présente un matériel granulaire uniformément réparti, sans tendance aux condensations marginales. Le nucléole, unique ou multiple, relativement volumineux, offre un aspect spongieux caractéristique.

Le cytoplasme ne présente aucun signe d'anoxie : on ne note pas d'images de dilatation des mitochondries ou du système réticulaire cytoplasmique.

Les mitochondries conservent leur structure normale. Exceptionnellement, dans les cellules riches en ergastoplasme, les mitochondries présentent dans leur matrice des plages claires.

L'appareil de Golgi, bien développé, est formé de quelques sacs aplatis, étroitement associés, de grosses vacuoles claires et de microvésicules.

Les inclusions graisseuses sont fréquentes, surtout dans les cellules localisées à la périphérie de l'explant. Elles présentent toujours des rapports étroits avec les mitochondries, point qui nous semble digne d'être relevé.

Dans les cellules qui présentent des signes de « vieillissement » on trouve des corps ovoïdes qui ont une densité inférieure à celle des inclusions graisseuses et dont la taille atteint et dépasse 700 Å et qui renferment de minuscules granules denses. Il s'agit de lipopigments dont les affinités tinctoriales sont une source d'erreur possible dans les

---

* L'étude des synthèses protéiques à l'aide des acides aminés marqués vient préciser cette observation. Les données radioautographiques concernant les explants préhypophysaires de jeunes rats, cultivés depuis trois semaines (en des conditions où la prolifération cellulaire est inexistante), plaident en faveur d'une activité synthétique de toutes les variétés cellulaires; cependant, les cellules ε sont le siège d'une activité synthétique notablement supérieure à celle des autres variétés.

essais de classification de ces cellules préhypophysaires pauvres ou dépourvues de granulations spécifiques.

De nombreuses cellules sont riches en grains de Palade, ce qui explique la pyroninophilie de la microscopie optique. Les grains de Palade sont soit groupés en tétrades libres, soit fixés sur les lamelles ergastoplasmiques.

La microscopie électronique confirme l'extrême rareté des granulations sécrétoires. Ainsi se trouve expliquée l'image de « chromophobie » généralisée à toutes les cellules telle qu'elle apparaît en microscopie optique après les colorations mettant en évidence les granulations chromophiles.

Ces grains sécrétoires sont de taille variable non seulement d'une cellule à l'autre, mais aussi dans une même cellule, ce qui rend leur identification aux divers types de granulations des cellules préhypophysaires très difficile. L'étude d'un grand nombre de coupes semi-fines et ultra-fines nous a permis cependant de distinguer diverses variétés de grains sécrétoires mûrs. Mais, la microscopie électronique nous a révélé un fait dont l'intérêt dépasse même le cadre de cette étude : les cellules préhypophysaires peuvent conserver en culture organotypique des caractères ultrastructuraux qui, même en l'absence des granulations secrétoires spécifiques, permettent de reconnaître plusieurs variétés cellulaires.

La classification des cellules préhypophysaires en culture organotypique reste tout de même ardue, d'autant plus que dans les conditions de la culture, on n'a plus la notion de rapport d'une cellule avec les vaisseaux, ni celle concernant le mode de distribution des granulations spécifiques dans le cytoplasme.

1) Dans les cellules α, le cytoplasme présente généralement un aspect clair. L'ergastoplasme prend la forme de citernes allongées et parallèles, à disposition périnucléaire et périphérique. Les granulations, rares, sont sphériques, denses, avec un diamètre oscillant entre 300 et 380 mμ (fig. 48).

2) Dans les cellules β, le cytoplasme, abondant, est bourré de vésicules ergastoplasmiques à contenu faiblement osmiophile. Plus rarement, ces vésicules ergastoplasmiques restent isolées et leur présence se traduit alors en microscopie optique par l'image d'un cytoplasme d'aspect chromophobe renfermant quelques fins « grains » PAS-positifs. Les vraies granulations, qui ne sont présentes qu'exceptionnellement, montrent une faible densité et un diamètre variant autour de 200 mμ (fig. 47).

3) Dans les cellules γ, le cytoplasme est plutôt réduit. L'ergastoplasme est par endroit nettement vésiculaire et peut présenter une réaction PAS-positive. Les grains sont denses et montrent dans une même cellule des diamètres qui varient entre 150 et 300 mμ (fig. 50bis).

4) Dans les cellules δ, le cytoplasme, généralement abondant, est caractérisé par une grande pauvreté en éléments granulaires et vésiculaires. Les mitochondries sont pâles. Les granulations spécifiques, peu denses, ont un diamètre de 100 à 130 mμ (fig. 49).

5) Dans les cellules ε, le cytoplasme est abondant et riche en matériel granulaire et vésiculaire. L'ergastoplasme a la forme de citernes allongées ou de grosses vacuoles. La zone golgienne est toujours bien développée. Les granulations spécifiques sont denses, de forme parfois ovale et de diamètres extrêmement variables, pouvant atteindre 600 mμ (fig. 46). C'est la seule variété cellulaire offrant les caractères ultrastructuraux d'une activité sécrétoire normale.

6) Un certain nombre de cellules, dont la taille est d'ailleurs inférieure à celle des autres variétés, ne montre pas de caractères ultrastructuraux spécifiques. Il s'agit ici de cellules indifférenciées telles qu'on les voit également dans la glande *in situ*.

Nous ne pouvons pas nous prononcer sur les pourcentages respectifs de ces diverses variétés cellulaires. Ainsi, les cellules ε sont toujours faciles à reconnaître, alors qu'il est rarement possible de diagnostiquer avec certitude une cellule γ. D'ailleurs est-il nécessaire de le dire, l'identification et la classification des cellules préhypophysaires est un problème qui non seulement offre de nombreuses inconnues, mais encore ne peut guère être valablement discuté sur les seules données de la morphologie. Ce que nous avons réussi à établir avec certitude, c'est que les rares granulations que l'on rencontre dans les diverses cellules préhypophysaires après culture organotypique prolongée présentent encore la même variabilité que dans la glande *in situ*.

La quasi-absence de granulations secrétoires mûres dans les cellules préhypophysaires en culture organotypique est une donnée importante du point de vue cytophysiologique. Mais il serait erroné de conclure qu'il s'agit de cellules en état de repos secrétoire. Le cytoplasme est généralement riche en fines vésicules et ces vésicules sont souvent le siège d'une ébauche de densification de leur contenu; seulement ce processus n'aboutit que rarement à la formation de véritables granulations secrétoires.

En résumé, les types cellulaires que nous avons décelés dans les explants préhypophysaires de Cobaye, mis en culture organotypique depuis plusieurs semaines, existent aussi dans la glande *in situ*.

Il est donc légitime de les tenir pour le résultat d'un état fonctionnel et non pas pour l'expression d'une dédifférenciation cellulaire. Au contraire, à la lumière des connaissances actuelles en cytologie, il est loisible d'admettre que de telles cellules, même si elles ne présentent pas tous les caractères d'un cycle secrétoire tel qu'il se déroule *in situ*, sont loin d'être au repos fonctionnel.

Selon Pasteels et Mulnard (1961) et Pasteels (1961), l'évolution en culture organotypique de la préhypophyse de Rat est caractérisée par

une atrophie des cellules α, β et γ et par une activité accrue des cellules ε allant de pair avec une sécrétion croissante de prolactine.

Nous venons de voir que nos recherches sur l'évolution en culture organotypique de la préhypophyse de Cobaye ont abouti à des conclusions voisines : la microscopie optique et la microscopie électronique apportent la preuve que les diverses variétés cellulaires présentent des signes d'une activité sécrétoire réduite, les cellules ε étant les seules à manifester une activité fonctionnelle normale.

La disparition des granulations secrétoires spécifiques de la préhypophyse dès la mise en culture organotypique, pose la question du mécanisme de ce phénomène. C'est là un problème de cytophysiologie générale auquel nous ne pourrons qu'apporter le résultat d'une constatation négative : il ne nous a jamais été possible de déceler un éventuel passage de granulations sécrétoires dans le milieu extra cellulaire sous une forme *figurée*. La présence de quelques granulations dans le milieu intercellulaire s'explique, nous y reviendrons dans le paragraphe suivant, non pas par un processus excrétoire actif, mais par une libération passive consécutive à la dégénérescence cytoplasmique.

Pour terminer la description d'un explant préhypophysaire au niveau des ultrastructures, ajoutons que la « membrane » qui entoure l'explant est formée de cellules dont les caractères ultrastructuraux attestent la nature préhypophysaire. Il nous faut toutefois relever deux particularités : la surface extérieure présente des microvillosités et les inclusions graisseuses intracytoplasmiques sont souvent nombreuses.

Nous avons écrit au début de ce paragraphe que du point du vue cytologique, nous n'avons pas décelé de différences significatives entre les explants cultivés respectivement par les procédés N° 1 et N° 2. Quelques précisions s'imposent cependant.

La migration et la prolifération centrifuges telles que nous les avons décrites dans le procédé N° 1, ne compromettent pas la conservation de l'explant préhypophysaire. Pourtant, si ces phénomènes s'accusent, l'explant perd son architecture normale et en même temps ses cellules constitutives diminuent encore de taille, leur cytoplasme s'appauvrit en structures ergastoplasmiques et les granulations secrétoires disparaissent totalement (fig. 1, à droite). Ces deux ordres de faits, relèvent-ils d'une cause commune ou bien découlent-ils les uns des autres ? En d'autres termes, convient-il de rechercher d'éventuelles relations de compétition entre les cellules propres de l'explant et les éléments cellulaires en croissance centrifuge ? Nous ne voulons pas trancher ce que nous n'avons pu résoudre expérimentalement.

On serait tenté de conclure que le procédé N° 2 l'emporte sur le procédé N° 1. Nous ne le pensons pas. D'abord le procédé N° 2 exige des repiquages répétés sur milieu frais, or toute manipulation de l'explant lui-même comporte des risques. Ensuite, en tubes tournants existe un lent courant du liquide de culture, ce qui a pour effet d'éviter l'épuisement local de substances nutritives et l'accumulation de déchets. Enfin, c'est par le procédé N° 1 que nous avons récolté le plus grand

nombre d'explants cultivés pendant de nombreuses semaines. Le seul inconvénient du procédé N° 1 réside dans l'existence d'une surface solide se prêtant à une migration centrifuge, – phénomène toujours indésirable en culture organotypique.

Pour remédier à cet inconvénient, nous avons mis au point, en collaboration avec A. Heusner (1961), un dispositif de culture où l'explant set maintenu en suspension dans la phase liquide. Nous avons renoncé au principe de cultiver un explant à la surface de séparation entre le milieu nutritif et la phase gazeuse tel qu'il est mis en œuvre par Fell (1928), Gaillard (1942, 1949), Martinovitch (1953), Wolff et Haffen (1952), Schaberg (1961) et beaucoup d'autres. L'explant est franchement immergé dans le liquide nutritif. On fait passer des bulles d'oxygène et de gaz carbonique à une cadence telle que les mouvements du liquide nutritif qui en résultent s'opposent à l'accolement de l'explant contre la paroi du récipient de culture : dans ces conditions, l'explant reste « en suspension » dans le liquide par ailleurs saturé en oxygène; l'édification d'une « membrane » unicellulaire sur *toute la surface* de l'explant s'en trouve favorisée et l'émigration cellulaire empêchée (Petrovic et Heusner, 1961).

b) EVOLUTION D'UN EXPLANT PRÉHYPOPHYSAIRE EN UN MILIEU DIT ANHORMONAL

La culture sur ce milieu entraîne en quelques jours la dégénérescence complète d'un explant préhypophysaire, que celui-ci ait été préalablement cultivé sur le milieu semi-synthétique ou bien fraîchement prélevé (Fig. 50).

Dans les cellules d'explants fraîchement prélevés, frappées d'emblée par la nécrose, on retrouve, au milieu des structures cytoplasmiques dégénérées, la quasi-totalité des granulations. Seules les cellules moins profondément altérées, qui survivent provisoirement, perdent leurs granulations. On peut en inférer que la disparition des granulations secrétoires en culture organotypique est liée à une activité fonctionnelle excrétoire de la cellule préhypophysaire.

Cette observation montre encore que la présence éventuelle de granulations secrétoires *entre* les cellules de l'explant est le résultat non pas d'un processus excrétoire actif, mais d'un phénomène de libération passive consécutive à la désintégration cytoplasmique. Il convient encore de préciser que la seule granulation que l'on trouve fréquemment dans le milieu intercellulaire est la variété acidophile. L'interprétation en est aisée : la fuchsinophilie d'un grain traduisant la densité de sa structure physico-chimique, il est facile de concevoir qu'il n'est pas d'emblée miscible au milieu intercellulaire.

En résumé, un milieu exclusivement à base d'extrait de jeunes embryons de Poulet n'est pas propice à une culture organotypique prolongée de la préhypophyse de Cobaye adulte.

c) ÉVOLUTION D'UN EXPLANT PRÉHYPOPHYSAIRE SUR LE MÉLANGE « MILIEU SEMI-SYNTHÉTIQUE – EXTRAIT DE CERVEAU EMBRYONNAIRE »

Une première conséquence de l'addition d'un extrait de cerveau embryonnaire concerne le nombre et la nature des cellules qui forment la zone de migration dans le procédé de culture N°1. En effet, l'émigration cellulaire apparaît notablement accrue. De plus, fait très important, on peut observer parmi les éléments qui migrent d'authentiques cellules préhypophysaires reconnaissables à leurs granulations spécifiques.

Une autre conséquence concerne l'architecture de l'explant préhypophysaire. Celui-ci est le siège d'importantes migrations cellulaires qui, non seulement bouleversent tous les rapports cellulaires, mais encore finissent par le « vider de sa substance »; l'explant initial devient alors une sorte de « fantôme » destiné à être désagrégé. Cela ne se produit toutefois qu'au bout de nombreuses semaines de culture.

Les modifications les plus intéressantes, de notre point de vue, sont d'ordre ultrastructural et doivent être recherchées dès la mise en culture.

En effet, l'adjonction au milieu semi-synthétique d'un extrait de cerveau embryonnaire de Poulet entraîne dans l'explant préhypophysaire des altérations cytologiques qui portent à la fois sur le noyau et le cytoplasme. Ces altérations sont d'autant plus importantes que les proportions de l'extrait sont plus grandes, que les embryons servant à la préparation de l'extrait sont plus jeunes et que la durée de culture est plus longue.

Nous décrirons *la nature* de ces modifications telles qu'elles apparaissent au microscope électronique.

Les noyaux cellulaires offrent fréquemment des images de condensation marginale (Fig. 51). Des densifications accusées, traduisant la pycnose nucléaire, ne se voient que dans les cellules en dégénérescence.

Le cytoplasme renferme des grains de Palade libres et de fines vésicules. L'ergastoplasme persiste sous la forme de quelques rares citernes parallèles (Fig. 55) ou bien de paquets de citernes ergastoplasmiques à disposition « tourbillonnaire », connus sous le nom de « Nebenkern ». Ce sont là des images de fin de cycle de l'ergastoplasme.

Les granulations secrétoires ne se retrouvent en quantité notable que dans les premiers jours de culture, en particulier dans les cellules à cytoplasme altéré. Cependant, la disparition des grains est plus lente qu'en milieu semi-synthétique pur. Selon notre manière de voir, on est amené à faire l'hypothèse que le processus excrétoire est ralenti à la suite des altérations que subissent les mitochondries et que nous allons décrire un peu plus loin.

Ce qui frappe encore, c'est la rareté des images typiques de différenciation fonctionnelle. On ne trouve qu'à l'état d'ébauche les carac-

tères ultrastructuraux propres à une variété cellulaire de la préhypophyse. Par exemple, les cellules β à cytoplasme rempli de vésicules à contenu faiblement dense – si fréquentes sur le milieu semi-synthétique – sont pratiquement absentes.

Mais l'altération la plus spécifique, remarquable par sa constance et sa précocité, concerne les mitochondries. Dans la majorité des cellules, même si elles sont en bon état de conservation, certaines mitochondries montrent un aspect évolutif particulier : la matrice mitochondriale s'éclaircit en même temps que l'organite gonfle et finit par se transformer en une volumineuse vésicule claire, renfermant à un pôle une masse fortement osmiophile. Cette masse osmiophile correspond probablement au matériel membranaire interne refoulé ou rétracté (Fig. 53 et 55). Autour de ces mitochondries en dégénérescence, on observe des mitochondries de petite taille et des petits corps ovoïdes et denses et qui traduiraient selon Rouiller et Bernhard (1956) la régénération mitochondriale.

Nous avons mentionné que les cellules glandulaires tendent à s'écarter les unes des autres (Fig. 51). Comme cet écartement ne se fait pas de façon uniforme le long des membranes cellulaires adjacentes, des zones de contact subsistent souvent entre deux cellules voisines dont l'une est en voie de migration. Des densifications cytoplasmiques marginales de type desmosome existent fréquemment au niveau des surfaces de contact. Certaines de ces cellules qui s'écartent les unes des autres ne migrent pas à proprement parler, mais s'aplatissent pour délimiter des cavités néoformées (Fig 52 et 53). Les membranes cellulaires bordant ces cavités présentent des microvillosités. Ces cavités, différentes des espaces conjonctifs, présentent un contenu clair (Fig. 53 et 54).

Les cellules qui tendent à migrer hors de l'explant sont très nombreuses. Soulignons que la migration ne s'accompagne pas de modifications ultrastructurales du cytoplasme qui lui soient propres. En cas de culture par le procédé N° 1, la présence de nombreuses cellules préhypophysaires typiques dans la zone de croissance centrifuge s'explique par cette migration allant de pair avec la multiplication.

Il convient de préciser que dans les espaces créés par la migration cellulaire, se dépose une substance amorphe ou d'aspect fibrillaire, associée à des fibrilles collagènes. On observe encore au sein de ces espaces, des débris nécrotiques et des sortes de sacs membraneux allongés et sinueux. Ces sacs correspondent à des enveloppes basales déshabitées (Fig. 52, 53 et 54). L'examen de nombreuses coupes nous a permis de conclure que cet aspect résulte, d'une part, d'atrophies cellulaires, d'autre part, de l'allongement par refoulement de la membrane basale tel qu'il est réalisé par la migration des cellules préhypophysaires. Il est intéressant de signaler que de telles images d'enveloppes basales déshabitées ont été observées par J. E. Gruner (1961) au cours d'atrophies musculaires et de formation de myoblastes.

d) CONCLUSIONS

L'étude morphologique de l'évolution d'un explant préhypophysaire de Cobaye adulte en diverses conditions de culture organotypique permet de tirer les conclusions suivantes :

- l'explant préhypophysaire tend à s'entourer *in vitro* d'une membrane vivante unicellulaire formée d'éléments glandulaires.
- la migration et la prolifération centrifuges sont conditionnées par les caractères physiques et physico-chimiques du support de culture et sont favorisées par des extraits embryonnaires.
- aucune des méthodes de culture dans cette recherche ne permet d'éviter la disparition rapide et quasi-totale des granulations sécrétoires.
- la conservation de certains caractères histochimiques et ultrastructuraux propres aux variétés cellulaires de la préhypophyse *in situ*, dans les explants cultivés en milieu semi-synthétique, est en faveur de la persistance d'une activité fonctionnelle spécifique. Les données convergentes de la microscopie optique et de la microscopie électronique permettent d'identifier dans l'explant préhypophysaire les cinq variétés de cellules chromophiles (α, β, γ, δ, ε). Ces diverses cellules présentent, toutes, des signes nets de l'activité sécrétrice, bien qu'à des degrés différents : les cellules ε apparaissent bien plus actives que les autres variétés cellulaires.
- les fragments préhypophysaires provenant d'un animal adulte ne se prêtent pas à une survie prolongée sur un milieu à base d'extrait embryonnaire. La conservation des cellules est d'autant moins bonne que l'embryon utilisé est plus jeune.
- l'adjonction d'un extrait de cerveau fœtal à un milieu semi-synthétique qui, seul, est capable d'assurer la culture organotypique prolongée d'un extrait préhypophysaire, entraîne d'importantes modifications tissulaires et cellulaires. La présence, en quantité suffisante, d'un tel extrait provoque un trouble de l'adhésivité intercellulaire : les cellules se séparent les unes des autres et migrent. Ces phénomènes s'observent dans l'explant tout entier et non seulement à la périphérie. L'émigration cellulaire hors de l'explant se trouve ainsi accrue. Parmi les modifications ultrastructurales des cellules préhypophysaires, une seule a une signification dégénérative : il s'agit des altérations mitochondriales. Cette dégénérescence partielle du chondriome s'accompagne de signes de régénération mitochondriale; elle risque néanmoins d'être à l'origine d'une déficience enzymatique responsable de la faible tendance évolutive des cellules cultivées sur ce milieu.
- la culture organotypique représente dans le cadre des recherches sur les rapports hypothalamo-préhypophysaires, un moyen d'analyse du fonctionnement préhypophysaire en l'absence de toute interven-

tion des centres nerveux. Une telle investigation implique évidemment le choix des conditions de culture. L'étude de l'état morphologique d'un explant préhypophysaire en fonction de la *nature* du milieu revêt une importance toute particulière : il ressort de nos recherches sur la préhypophyse de Cobaye adulte que la présence d'extraits embryonnaires peut être responsable à elle seule de modifications ultrastructurales à caractère involutif.

2 - Propriétés fonctionnelles des explants préhypophysaires en culture organotypique : fonctions gonadotrope, corticotrope et thyréotrope

Il ressort de nos recherches concernant l'évolution morphologique des explants préhypophysaires en culture organotypique qu'en certaines conditions de milieu les cellules glandulaires conservent un nucléole volumineux, un appareil de Golgi caractéristique, de nombreuses mitochondries et, fait essentiel, un ergastoplasme plus ou moins bien développé. Ce sont là indiscutablement les indices d'une activité glandulaire. Ne manque, au fait, que la preuve finale sous la forme d'un stockage figuré du produit de sécrétion. En réalité, l'accumulation d'un matériel granulaire n'étant qu'un aspect particulier de la fonction glandulaire, l'absence d'élaboration des grains sécrétoires mûrs ne peut être considérée comme l'expression du repos fonctionnel.

La démonstration de la valeur fonctionnelle de l'explant préhypophysaire incombait en définitif à la méthode physiologique. Encore fallait-il choisir le procédé d'investigation susceptible d'apporter une réponse directe au problème posé.

Il eut été possible d'évaluer le contenu hormonal d'un explant préhypophysaire en diverses conditions de la culture. Mais c'est un procédé dont les résultats, en soi, ne nous eussent guère informé sur les aspects dynamiques du fonctionnement hypophysaire.

On eut pu encore rechercher les produits de l'activité sécrétoire de la *pars distalis* dans le milieu de culture. C'est un procédé qui, lui, emporte d'emblée l'adhésion du physiologiste puisqu'il permet d'éprouver la valeur fonctionnelle effective d'une glande endocrine dans les conditions bien définies. Il n'est cependant pas non plus sans inconvénients, le plus important, du point de vue méthodologique, étant représenté par une éventuelle instabilité des hormones protéiques. Car cette méthode qui vise à recueillir quantitativement les hormones excrétées pendant un laps de temps choisi, n'est valable qu'à la condition que la totalité des hormones excrétées durant l'épreuve reste active à la fin de l'expérience.

Aussi avons-nous donné notre préférence à un procédé différent, celui de l'association *in vitro,* pendant un temps défini, de la préhypophyse avec un organe – effecteur spécifique. Dans ce cas, en effet, les hormones excrétées peuvent agir sur l'organe effecteur pendant toute la durée de l'association. Il va de soi que moins une hormone est sta-

ble, moins grande seront les concentrations mises en œuvre et moins intenses seront les effets observés.

Le procédé d'association qui offre donc, à notre avis, de sérieuses garanties de sensibilité et de fidélité, présente encore d'autres avantages. Quand il s'agit d'hormones préhypophysaires, on est encore réduit, à l'heure actuelle, aux dosages biologiques. Or lorsque l'on cherche à évaluer l'activité d'une hormone *in vivo,* on se heurte à cet ensemble éminemment variable qu'est le système endocrinien. *In vitro,* en revanche, le « contexte » hormonal représenté par le milieu de culture ne se modifie pas en fonction des variations quantitatives d'une hormone donnée.

La détermination de l'activité fonctionnelle de l'explant préhypophysaire par la méthode de l'association directe avec un organe effecteur comporte cependant une source d'erreur possible. Nous pensons à l'éventualité d'une rétro-action, phénomène plus ou moins constant dans le système endocrinien. Aussi avons-nous pris la précaution de choisir l'organe effecteur à un stade de son développement histogénétique assez précoce pour être dépourvu d'une activité hormonale notable et assez évolué pour être déjà sensible à la stimulation préhypophysaire. Cela fut relativement facile à réaliser pour la thyroïde, un peu moins pour le testicule et assez difficile pour la surrénale dont on connaît avec moins de précision la date de l'entrée en fonction chez diverses espèces. D'autre part, une éventuelle interaction entre les deux explants ne se réduit pas à des effets de nature hormonale. Pour cette raison, nous avons toujours pris le soin d'associer les organes effecteurs, à titre de contrôle, à des fragments d'organes réputés dépourvus d'une action spécifique sur les glandes endocrines, tels que le myocarde, le poumon ou le mésonéphros embryonnaires.

Restait le problème du choix d'un milieu de culture pour la durée de l'association.

En ce qui concerne l'association avec le testicule et la thyroïde, nous n'avons pas hésité à faire appel au milieu anhormonal. En effet, les travaux de Moszkowska (1956) et de Tixier-Vidal (1958) ont apporté la preuve qu'aux stades choisis ces deux organes pouvaient survivre et réagir aux hormones préhypophysaires sur le milieu anhormonal de Wolff et Haffen (1952).

Ce milieu, nous l'avons vu, n'est guère propice à la préhypophyse. Nous estimons toutefois que ce léger inconvénient est largement compensé par l'avantage d'un milieu dépourvu d'hormones, d'autant plus que les durées d'association sont relativement courtes.

Des recherches actuellement en cours renforcent d'ailleurs ce point de vue, puisqu'elles suggèrent que les effets observés sont l'œuvre, pour une part essentielle, de l'action hormonale qui s'est accomplie dans les premières heures de l'expérience (A. Petrovic, en préparation).

En ce qui concerne l'association avec le cortex surrénalien, le milieu anhormonal s'est avéré impropre. Aussi avons-nous été obligé de faire appel au mélange « liquide semi-synthétique-extrait de cerveau fœtal ».

Ce n'est évidemment pas un milieu anhormonal, mais il est du moins, pratiquement, dépourvu d'hormones préhypophysaires; le sérum, rappelons-le, provient d'un animal totalement hypophysectomisé depuis au moins 10 jours. D'ailleurs, de toute façon, nous apprécions les effets qu'exerce l'explant préhypophysaire sur le cortex surrénalien par comparaison avec une expérience de contrôle. Or, tous les facteurs du milieu nutritif susceptibles d'agir directement sur l'explant corticosurrénalien sont réduits à des valeurs fixes.

Avant que d'aborder l'étude des associations *in vitro* entre la préhypophyse et les organes-effecteurs, il nous faut encore évoquer le problème des localisations, chez le Cobaye, des diverses variétés cellulaires préhypophysaires dans la glande *in situ*. L'on sait, en effet, depuis les travaux de Kirkman (1937), de Giroud et Desclaux (1947), de Giroud et Martinet (1948) et de Rebel et Marescaux (1958) que les divers types de cellules chromophiles ne sont pas distribués uniformément, mais occupent des zones relativement bien définies. Les cellules acidophiles, très nombreuses, sont présentes dans toutes les régions, mais deviennent pratiquement le seul élément chromophile dans une étroite zone postéro-latérale. Les cellules cyanophiles du type β sont localisées dans la zone antéro-latérale de la glande, et, en outre, s'enfoncent en coin, d'avant en arrière, selon l'axe longitudinal de l'organe. Les cellules cyanophiles du type δ, relativement rares chez le Cobaye (Rebel et Marescaux, 1958) occupent une étroite bande antéro-latérale. La région centrale est formée, chez le Cobaye, de cellules de toutes les variétés, généralement pauvres en granulations chromophiles sans que l'on puisse parler, à notre avis, de cellules véritablement « chromophobes ».

Une telle répartition topographique des diverses variétés de cellules chromophiles, permet d'exciser, en vue de la culture, un fragment provenant soit de la zone postéro-latérale, à prédominance acidophile, soit de la zone antérieure, siège des cellules cyanophiles, soit de la zone centrale, essentiellement mixte. C'est là un principe que nous avons déjà mis en œuvre dès nos premières expériences d'homogreffe intratesticulaire de la préhypophyse chez le Cobaye (Petrovic, Weill et Deminatti, 1953 a) et dont nous avons tiré profit au cours des recherches sur le contrôle hypothalamique et la localisation des sécrétions gonadotrope, thyréotrope et corticotrope dans la glande pituitaire (Aron et Petrovic, 1959, 1960).

Il va de soi qu'un fragment n'est jamais constitué d'une seule variété cellulaire. Il est cependant possible qu'un fragment soit composé presque exclusivement de cellules acidophiles ou bien en majorité de cellules cyanophiles. Dans ces conditions, l'intensité d'une action hormonale peut éventuellement varier selon l'origine topique d'un explant préhypophysaire. Sans vouloir anticiper sur les résultats obtenus, nous tenons tout de même à souligner un fait important : l'application des techniques préconisées en cytologie préhypophysaire par Herlant (1956, 1958, 1961) montre avec évidence que la zone « acidophile » n'est pas constituée uniquement de cellules α, mais également de cellules ε

et même de cellules γ. Il en résulte que l'interprétation des résultats obtenus en culture organotypique devient délicate : nous avons vu, en effet, qu'il est très difficile, sinon impossible, d'identifier à coup sûr *toutes* les cellules constitutives d'un explant préhypophysaire cultivé depuis plusieurs semaines. Or, aussi longtemps que l'on ignore la composition cellulaire exacte d'un fragment préhypophysaire, il nous paraît illusoire de vouloir tirer des conclusions sur la signification fonctionnelle d'une variété cellulaire.

a) ASSOCIATION DE PRÉHYPOPHYSE AVEC LE TESTICULE EMBRYONNAIRE

1) *Principe de l'expérience.* – Un fragment de préhypophyse de Cobaye mâle adulte, fraîchement prélevé ou préalablement prélevé ou préalablement cultivé de 1 à 30 jours, est associé en culture organotypique pendant 72 heures avec un fragment de testicule de l'embryon de Poulet au stade de 16 jours d'incubation.

Nous avons complété ces expériences par celles d'association *in vitro* de la préhypophyse de Cobaye avec des gonades de Souriceaux nouveau-nés.

2) *Relations préhypophyse-testicule chez l'embryon de Poulet.* – Les données dont on dispose actuellement au sujet des corrélations préhypophyso-testiculaires chez l'embryon de Poulet sont encore fragmentaires.

Le testicule de l'embryon de Poulet se développe selon un mode dont les caractères histologiques sont bien établis. Nous n'avons pas à insister non plus sur ses propriétés fonctionnelles. De très nombreuses recherches ont montré que le testicule embryonnaire a une activité hormonogène et que l'avènement de cette fonction est même très précoce (voir à ce sujet · Wolff, 1950).

Il n'en va pas de même en ce qui concerne le déterminisme de l'activité sécrétoire du testicule embryonnaire. Wolff et Stoll (1937) et Stoll (1939), à la suite de leurs études des cyclocéphales expérimentaux, ont conclu que malgré l'agénésie de l'hypophyse, le développement génital est normal.

En revanche, Fugo (1940), en pratiquant l'hypophysectomie chez les embryons de Poulet de 33 à 38 heures, constate une déficience dans le développement du stroma testiculaire, qui apparaît vers le 13^{e} jour d'incubation.

Du point de vue où nous nous sommes placé, les données les plus importantes sont apportées par les recherches de Moszkowska (1956) sur la sensibilité du testicule à l'hormone gonadostimulante. En cultivant les testicules d'embryons de Poulet, prélevés aux stades de 16 à 17 jours d'incubation, en association avec des glandes pituitaires d'embryons de même âge, cet auteur constate une réaction évidente de l'effecteur gonadique à la stimulation hypophysaire *in vitro :* élargis-

sement des cordons sexuels mâles, augmentation du nombre des cinèses goniales, formation de tubes sexuels munis d'une lumière centrale.

Ces observations de Moszkowska ont servi de base à nos propres recherches sur l'activité gonadostimulante d'explants préhypophysaires de Cobaye adulte en culture organotypique.

3) *Propriétés fonctionnelles des explants préhypophysaires de Cobaye associés in vitro avec le testicule embryonnaire de Poulet. – Conduite des expériences.* – Nous avons utilisé, en vue de ces recherches, le milieu anhormonal, enrichi d'acides aminés et de vitamines hydrosolubles.

Le testicule de l'embryon de Poulet, prélevé au stade de 16 jours d'incubation, est divisé en 5 fragments. Deux fragments sont cultivés seuls ou en association avec le myocarde ou le mésonéphros, à titre de contrôle. Trois autres fragments sont associés, chacun, avec 2 explants préhypophysaires provenant de Cobaye mâle adulte. Les explants de *pars distalis* sont fraîchement prélevés ou préalablement cultivés pendant 1 à 25 jours sur le milieu semi-synthétique, avec ou sans extrait de cerveau embryonnaire. L'accolement est réalisé au niveau de la surface de section du testicule afin de faciliter la soudure *.

Les explants sont maintenus à la température de 32°C pendant 72 heures. Les explants sont alors fixés au Bouin-Hollande, débités en coupes de 5 et colorés à l'hématoxyline-éosine, au PAS, à la fuchsine-paraldéhyde de Gomori et au vert de méthyle-pyronine.

Résultats expérimentaux. – Le tableau des deux pages suivantes résument les principales modalités expérimentales ainsi que les résultats obtenus (tableau I) :

* Après quelques essais préliminaires, nous avons renoncé à pratiquer des associations à distance, car une éventuelle gonadostimulation dans ces conditions nous a paru difficile à déceler.

TABLEAU I

1) Expériences de contrôle Modalité expérimentale	Nombre de cas
t seul	88
t et my	24
t et mn	19

2) Expériences d'association avec la préhypophyse fraîchement prélevée Modalité expérimentale	Nombre de cas et intensité de la réponse
t et H B fp	26 ++ (17) + (9)
t et H M fp	10 ++ (6) + (4)
t et H A fp	16 ++ (9) + (7)

3) Expériences d'association avec la préhypophyse préalablement cultivée Modalité expérimentale	Nombre de cas et intensité de la réponse	
	sur le milieu semi-synthétique	sur le mélange « milieu semi-synthétique-extrait de cerveau fœtal »
t et H B pc 1	6 ++ (4) + (2)	
t et H A pc 1	6 ++ (3) + (3)	
t et H B pc 3	8 ++ (4) + (4)	8 ++ (7) + (1)
t et H A pc 3	8 ++ (3) + (5)	6 ++ (4) + (2)
t et H B pc 6	6 + (2) + (4)	
t et H A pc 6	5 + (2) ± (3)	
t et H B pc 8	6 + (1) ± (5)	6 ± (4) 0 (2)
t et H A pc 8	6 + (1) ± (5)	6 ± (6)

t et H B pc 14	5	± (3) 0 (2)	5	± (2) 0 (3)
t et H A pc 14	6	± (2) 0 (4)	4	± (2) 0 (2)
t et H B pc 21	8	± (5) 0 (3)	6	0 (6)
t et H A pc 21	7	± (4) 0 (3)	4	0 (4)
t et H B pc 28	10	± (5) 0 (5)		
t et H A pc 28	8	± (2) 0 (6)		

t : testicule d'embryon de Poulet
my : myocarde embryonnaire
mn : mésonéphros
H : préhypophyse de Cobaye
B : zone « basophile »
A : zone « acidophile »
M : zone « mixte »
fp : fraîchement prélevée
pc : préalablement cultivée (en jours)

L'intensité de la réponse est évaluée par comparaison avec l'explant testiculaire témoin. Par définition, nous avons désigné la réponse la plus plus forte par ++.

1) Caractères morphologiques de testicule d'embryon de Poulet au stade de 16 jours cultivé seul ou en association avec le myocarde ou le mésonéphros.

Après 3 jours de culture, l'explant testiculaire ne montre pas de modifications significatives par rapport à l'état initial. Les cordons sexuels, dont le diamètre moyen varie dans les mêmes proportions qu'*in vivo*, renferment, à la périphérie, des petites gonies et des cellules de Sertoli et au centre des grandes gonies, parmi lesquelles on peut observer, mais rarement, des images de mitose (Fig. 2). Les cellules interstitielles, bien différenciées à ce stade embryonnaire, conservent leur aspect normal.

La présence d'un fragment de myocarde ou de mésonéphros embryonnaires a un effet favorable sur la survie de l'explant testiculaire, comme l'a déjà signalé Moszkowska (1956), mais ne modifie pas de façon évidente le contenu des cordons sexuels.

2) Caractères morphologiques du testicule de l'embryon de Poulet au stade de 16 jours cultivé *in vitro* en association avec un explant préhypophysaire fraîchement prélevé chez un Cobaye adulte.

L'association en culture organotypique d'un fragment de préhypophyse de Cobaye adulte avec un fragment de testicule d'embryon de Poulet entraîne en quelques heures leur accolement. Une membrane unicellulaire commune s'édifie autour des deux explants.

La limite entre les tissus des deux organes juxtaposés reste nette, il n'y a pas d'interpénétration (Fig. 3). Aucune incompatibilité caractérisée, de nature immunologique ou autre, ne se manifeste *in vitro,* même après 15 jours de culture entre ces deux organes provenant de classes zoologiques différentes et dont l'un est prélevé chez un animal adulte.

L'examen de l'explant testiculaire associé *in vitro* avec la préhypophyse montre, en comparaison avec l'explant testiculaire cultivé à titre de témoin, un léger accroissement du diamètre des cordons sexuels et, surtout, une augmentation du nombre de cellules germinales en mitose (Fig. 3). Nous n'avons observé qu'exceptionnellement une véritable transformation de cordons en tubes sexuels. Quant aux cellules interstitielles, elles n'ont pas présenté de modifications cytologiques décelables au microscope optique dans les délais de nos observations.

3) Caractères morphologiques du testicule de l'embryon de Poulet au stade de 16 jours cultivé *in vitro* en association avec un explant préhypophysaire préalablement cultivé.

Lorsqu'un explant préhypophysaire, prélevé chez un Cobaye adulte, est cultivé avant l'association avec un testicule fraîchement prélevé, plusieurs cas peuvent se présenter :

- si la culture préalable est réalisée sur le milieu semi-synthétique, l'explant préhypophysaire suscite dans le testicule les modifications décrites ci-dessus. Mais celles-ci deviennent nettement plus difficiles à déceler dès que la durée de culture préalable de la préhypophyse dépasse une semaine. Dans ce cas, l'action n'est souvent évidente que dans les cordons testiculaires localisés au voisinage immédiat de l'explant de *pars distalis* (Fig. 4).
- Si la culture préalable est réalisée sur le milieu semi-synthétique additionné d'un extrait de cerveau embryonnaire, l'association de l'explant préhypophysaire reste pratiquement sans effet sur l'explant testiculaire (Fig. 5).

4) *Propriétés fonctionnelles des explants préhypophysaires de Cobaye associés in vitro avec des gonades de Souriceaux nouveau-nés.* - Nous ne ferons qu'une brève mention de ces expériences qui ont visé à étendre sur les gonades d'un Mammifère les observations faites sur le testicule de l'embryon de Poulet.

Le milieu de culture est le même que celui mis en œuvre dans les expériences sur le testicule d'embryon de Poulet.

L'examen d'un fragment de testicule de Souriceau nouveau-né associé *in vitro* pendant 5 jours avec un explant préhypophysaire de

Cobaye, montre que le diamètre des tubes sexuels et, surtout, la taille des cellules interstitielles sont supérieurs à ce que l'on observe dans un explant testiculaire cultivé à titre de témoin. Il résulte de la comparaison avec le testicule du Souriceau nouveau-né non cultivé que l'explant préhypophysaire remédie, partiellement, à l'involution structurale qui est le sort habituel du testicule de Souriceau nouveau-né en culture organotypique, du moins dans les conditions expérimentales où nous nous sommes placé.

Il convient de préciser qu'ici encore, les effets observés deviennent plus difficiles à mettre en évidence dès que l'explant préhypophysaire a été préalablement cultivé pendant plus de 4 à 6 jours.

Nous avons limité nos recherches sur les effets gonadotropes d'un explant préhypophysaire en culture organotypique à l'étude chez l'embryon de Poulet mâle. Quelques essais chez l'embryon de Poulet femelle ne nous ont pas permis de déceler des modifications ovariennes susceptibles de servir de test de l'activité gonadostimulante. Il n'en va pas de même avec la femelle de Souriceau : en associant pendant 5 jours un fragment de préhypophyse de Cobaye avec un ovaire de Souriceau de 3 jours, nous avons fréquemment pu assister à l'organisation d'une thèque interne allant de pair avec une certaine tendance à la croissance des follicules primaires. Dans l'ovaire cultivé seul ou en association avec le myocarde, à titre de témoin, les follicules primaires présentent des signes d'involution, touchant non seulement les cellules granuleuses, mais encore les ovocytes eux-mêmes. Comme l'a noté Van de Kerckhove (1958), c'est souvent l'assise des cellules granuleuses entourant directement l'ovocyte qui dégénère la première.

Les effets sur l'ovaire sont particulièrement nets avec des explants de *pars distalis* fraîchement prélevés ou cultivés préalablement pendant des courts délais.

5) *Discussion et conclusions.* – Un fragment de préhypophyse de Cobaye adulte exerce en culture organotypique, dans les conditions de contact direct entre les parenchymes sécréteur et récepteur, des effets stimulants sur les cordons sexuels du testicule de l'embryon de Poulet de 16 jours d'incubation. Les modifications morphologiques de même nature ont déjà été produites *in vitro* par Moszkowska (1956) en utilisant l'hypophyse embryonnaire de Poulet. Cependant, dans la mesure où l'on peut, sur la base de ces expériences, émettre une appréciation quantitative, l'hypophyse de Cobaye, même fraîchement prélevée, exerce sur le testicule embryonnaire de Poulet, des effets d'une intensité inférieure à celle de l'hypophyse embryonnaire de Poulet. En effet, l'association du testicule d'embryon de Poulet avec la préhypophyse de Cobaye n'a pas entraîné, dans nos expériences, l'élargissement des cordons sexuels, tel qu'il a été observé par Moszkowska (1956) après adjonction *in vitro* de la glande pituitaire d'embryon de Poulet. Comme dans les expériences de Moszkowska (1956), le testicule embryonnaire de Poulet a réagi à la préhypophyse par une augmentation du nombre de cinèses goniales. Mais, cette réaction s'est révélée moins

intense avec la préhypophyse de Cobaye qu'avec la préhypophyse embryonnaire de Poulet. On ne pourra expliquer ces différences qu'après l'étude qualitative et quantitative des substances hormonales pures préparées à partir des glandes pituitaires de ces diverses espèces animales.

L'évolution spermatogénétique ne dépasse jamais le stade de spermatogonie, même si l'on prolonge la durée de culture jusqu'à 15 jours. Nous ne pouvons que prendre acte de cette absence totale des phénomènes de maturation. De toute façon, on ne saurait l'attribuer à une simple carence secrétoire de la *pars distalis :* qualitativement les fragments préhypophysaires fraîchement prélevés exercent sur le testicule les mêmes effets que les explants préalablement cultivés.

En ce qui concerne la nature de l'hormone responsable des modifications du testicule embryonnaire, nous ne pouvons que rappeler que depuis les premiers travaux de Fevold et ses collaborateurs (1931), de Greep et Fevold (1937), l'on admet que la multiplication des spermatogonies résulte d'une action de l'hormone folliculo-stimulante (F.S.H.).

Nos expériences d'association avec le testicule de Souriceau attestent qu'un explant préhypophysaire de Cobaye est capable d'exercer également les effets que l'on attribue depuis Fevold et ses collaborateurs (1931), Greep et Fevold (1937) à l'hormone stimulant le tissu interstitiel (I.C.S.H.). Les expériences de Lostroh (1960) apportent d'ailleurs une démonstration expérimentale à cette façon de voir : l'incorporation au milieu de culture d'une gonadostimuline chorionique humaine entraîne dans le testicule de Souriceau de 3 jours les modifications structurales telles que nous les avons observées en présence d'un explant préhypophysaire de Cobaye. Nous en avons inféré qu'un explant préhypophysaire était capable d'exercer *in vitro* les mêmes effets qu'une hormone gonadotrope stimulant le tissu interstitiel (I.C.S.H.). Restait l'objection qu'une autre hormone hypophysaire, la prolactine, pouvait éventuellement, elle aussi, exercer de tels effets sur le testicule. Cette éventualité peut cependant être rejetée, car il ressort des travaux de Lostroh (1960) qu'une préparation de prolactine reste dans les mêmes conditions expérimentales sans action sur le testicule de Souriceau.

Les expériences d'association avec l'ovaire de Souriceau sont plus difficiles à interpréter. Nous devons signaler que Lostroh (1959) a fait des observations sensiblement identiques aux nôtres en cultivant un ovaire de Souris nouveau-née sur un milieu renfermant une préparation hormonale du type I.C.S.H.

Pour terminer, il convient de souligner deux points. Premièrement, nous n'avons pu mettre en évidence d'éventuelles différences dans l'intensité d'action des explants préhypophysaires en fonction de leur origine topique dans la glande *in situ.* Deuxièmement, l'activité gonadostimulante d'un explant de *pars distalis* de Cobaye, telle qu'elle se manifeste dans nos expériences d'association avec le testicule embryonnaire de Poulet ou avec les gonades de Souriceau nouveau-né,

décroît notablement après quelques jours de culture; elle ne semble cependant pas disparaître com plètement – à condition d'utiliser, lors de la culture préalable de la préhypophyse, un milieu nutritif ne comportant pas un extrait embryonnaire en quantités importantes.

b) ASSOCIATON DE PRÉHYPOPHYSE ET DE CORTICOSURRÉNALE.

1) *Principe de l'expérience.* – Un fragment de préhypophyse de Cobaye adulte, fraîchement prélevé ou préalablement cultivé de 1 à 26 jours, est associé en culture organotypique pendant 1 à 5 jours avec un fragment de corticosurrénale de fœtus de Cobaye à des stades s'échellonnant de 50 à 70 jours de gestation.

Dans un nombre réduit d'expériences, nous avons fait appel à une autre espèce animale, le Hamster ordinaire *(Cricetus cricetus).*

2) *Relations préhypophyse-corticosurrénale chez les Mammifères.* – Le rôle de la préhypophyse dans le fonctionnement de la cortico-surrénale est chaque jour mieux connu. L'exploration de l'activité adrénocorticotrope préhypophysaire a bénéficié des efforts conjugués de morphologistes, de physiologistes et de biochimistes et a abouti à un des systèmes de notions les plus cohérents de l'endocrinologie expérimentale.

Le problème de l'activité corticotrope *in vitro* a été abordé de plusieurs manières.

Guillemin et Rosenberg (1955) cultivent la préhypophyse de Rat et de Chien et recherchent, à l'aide du test de déplétion de l'acide ascorbique (test de Sayers, Sayers et Woodbury, 1948) la présence de l'hormone corticotrope (ACTH) dans le milieu de culture. Au bout d'une période de culture de 4 jours, l'ACTH est présent dans le milieu d'incubation. Mais après des délais plus longs, la méthode utilisée ne permet plus de déceler une libération de l'ACTH, à moins d'associer à la préhypophyse *in vitro* des fragments d'hypothalamus.

Saffran et Schally (1955) incubent simplement la préhypophyse de Rat et constatent qu'après une heure le milieu d'incubation contient une petite quantité d'ACTH.

Schaberg (1961) aborde le problème de l'activité corticotrope *in vitro* par la méthode des associations entre la préhypophyse et la corticosurrénale chez le Rat. Cet auteur note, sous l'influence de la préhypophyse ou de l'ACTH, une transformation des cellules glomérulaires en cellules fasciculées allant de pair avec une augmentation significative de la production des hormones corticostéroïdes. Cette production d'hormones traduisant l'activité des cellules préhypophysaires en culture organotypique diminue après une période de 12 jours.

Les recherches de Martinovitch (1961) concernent la préhypophyse de Rat de 20 jours, cultivée *in vitro* pendant 30 jours et associée pendant les 3 ou 4 derniers jours avec la corticosurrénale fraîchement

prélevée chez un Rat de 5 jours. L'auteur conclut à la persistance d'une activité préhypophysaire corticotrope après 30 jours de culture organotypique.

3) *Propriétés fonctionnelles des explants associés* in vitro *avec la corticosurrénale de fœtus de Cobaye. – Conduite des expériences.* – Un fragment de cortex surrénalien fraîchement extirpé chez un fœtus de Cobaye entre le 50e et le 70e jour de développement est cultivé pendant 1 à 5 jours, soit seul, soit en association avec un fragment préhypophysaire de Cobaye adulte. L'explant préhypophysaire est fraîchement prélevé ou préalablement cultivé sur le milieu semi-synthétique, additionné ou non d'un extrait de cerveau fœtal. Les effets de l'explant préhypophysaire sur le cortex surrénalien ont été appréciés par comparaison avec l'explant corticosurrénalien cultivé à titre de témoin seul ou en association avec le myocarde embryonnaire de Poulet. Les explants sont cultivés à 37°C. Ils sont ensuite fixés et examinés en microscopie optique et en microscopie électronique.

Résultats expérimentaux. – Le tableau résume les principales modalités expérimentales ainsi que les résultats obtenus :

1) Caractères morphologiques de l'explant corticosurrénalien de fœtus de Cobaye cultivé seul ou en association avec le myocarde.

Nous avons montré (Petrovic, 1960a, 1960b) que sur le milieu semi-synthétique, additionné d'un extrait de cerveau embryonnaire, seuls les fragments découpés dans la région superficielle du cortex surrénalien d'un fœtus de Cobaye en fin de gestation se prêtent à une culture organotypique prolongée (Fig. 6 et 7). Notre méthode de culture d'organes en milieu continuellement oxygéné (Petrovic et Heusner, 1961) nous a permis, tout récemment, de réaliser le maintien de *toutes les trois couches* du cortex surrénalien de Rat pendant des délais dépassant trois semaines. Nous y reviendrons dans un prochain article.

Les meilleures conditions de survie sont réalisées lorsque l'on découpe le fragment à cultiver de façon qu'en s'arrondissant *in vitro,* il devienne complètement entouré par les tissus ayant fait partie de la capsule de l'organe. Nous nous sommes efforcé d'exciser le fragment à cultiver de façon qu'il ne comporte pas de tissu voué *in vitro* à la dégénérescence.

Après 2 à 4 semaines de culture, on distingue en allant de la périphérie vers le centre de l'explant :

– une mince capsule cellulaire et fibrillaire de nature conjonctive.
– une zone sous-capsulaire, plus ou moins large, formée d'une nappe de cellules à limites cytoplasmiques peu précises et à noyaux clairs dont le grand axe est parallèle à la surface de l'explant.
– des groupes de cellules dont la petite taille, le volume réduit du cytoplasme, le noyau chromatique et la basophile cytoplasmique attestent leur provenance de la zone glomérulaire. Les mitoses sont

TABLEAU II

1) Expériences de contrôle Modalité expérimentale	Nombre de cas
C seule	63
C et my	10
C et p	8

2) Expériences d'association avec la préhypophyse fraîchement prélevée Modalité expérimentale	Nombre de cas et intensité de la réponse
C et H B fp	16 +++(1) ++(7) +(8)
C et H M fp	12 +++(7) ++(5)
C et H A fp	15 +++(11) ++(4)

3) Expériences d'association avec la préhypophyse préalablement cultivée Modalité expérimentale	Nombre de cas et intensité de la réponse	
	sur milieu semi-synthétique	sur mélange « milieu semi-synthetique-extrait de cerveau fœtal »
C et H M pc 1	10 +++(2) ++(8)	
C et H A pc 1	8 +++(4) ++(4)	
C et H M pc 2	9 +++(4) ++(5)	
C et H A pc 2	8 +++(5) ++(3)	
C et H M pc 3	10 +++(1) ++(3) +(6)	7 +++(2) +(5)
C et H A pc 3	12 +++(4) ++(8)	8 ++(5) +(3)
C et H M pc 5	14 ++(3) +(11)	9 +(5) ±(4)

C et H A pc 5	11	++(11)	7	+(6) ±(1)
C et H M pc 6	10	++(4) +(6)	6	+(3) ±(3)
C et H A pc 6	10	++(7) +(3)	5	+(4) ±(1)
C et H M pc 8	6	+(4) ±(2)	4	±(3) 0(1)
C et H A pc 8	4	+(8)	3	±(3)
C et H M pc 12	8	+(3) ±(4) 0(1)	5	±(1) 0(4)
C et H A pc 12	7	+(4) ±(3)	6	±(4) 0(2)
C et H M pc 14	5	±(5)		
C et H A pc 14	4	+(2) ±(2)		
C et H M pc 20	5	±(1) 0(4)	6	—(6)
C et H A pc 20	5	±(3) 0(2)	8	±(2) 0(6)
C et H M pc 26	4	±(1) 0(3)		
C et H A pc 26	5	±(2) 0(3)		

C : corticosurrénale
my : myocarde
p : poumon
H : préhypophyse
B : zone « basophile »
M : zone « mixte »
A : zone « acidophile »
fp : fraîchement prélevée
pc : préalablement cultivée (en jours)

L'intensité de la réponse est évaluée par comparaison avec l'explant corticosurrénalien cultivé à titre de témoin. Par définition, la réponse la plus forte est désignée par +++.

rares, mais plus fréquentes parmi les cellules glomérulaires que dans la zone sous-capsulaire.

Si un tel explant comporte des spongiocytes, ceux-ci montrent dès le deuxième ou le troisième jour de culture un noyau petit et hyperchromatique et un cytoplasme macrovacuolaire (Fig. 6). Ce sont là des signes morphologiques d'involution fonctionnelle tels qu'on les observe en certaines conditions expérimentales chez le Cobaye (Aron et Petrovic, 1959). Mais, dans nos expériences *in vitro,* ils sont suivis à brefs délais d'une dégénérescence complète.

Les fragments excisés en plein parenchyme corticosurrénalien correspondant à la zone fasciculée, subissent à tout coup des modifications involutives aboutissant en quelques jours à la dégénérescence.

Seules les surrénales provenant des fœtus de Cobaye aux stades plus jeunes peuvent conserver, en plus de la zone glomérulaire, au moins les couches extérieures de la zone fasciculée.

Le recours à la microscopie électronique nous a permis de préciser les caractères cytologiques des explants de corticosurrénale provenant de fœtus de Cobaye.

Les cellules à caractères spongiocytaires présentent les premiers signes de dégénérescence après 24 à 48 heures de culture. Ce processus dégénératif s'accentue dans les jours suivants pour aboutir rapidement à une nécrose quasi totale des cellules de la zone fasciculée (Fig. 67). En revanche, les cellules des zones sous-capsulaire et glomérulaire subissent peu de modifications. Après 5 jours de culture, leur ultrastructure reste comparable à celle observée *in situ* dans la surrénale au même stade fœtal. Les cellules sous-capsulaires sont inchangées. Les cellules glomérulaires diminuent de taille, mais leur réticulum cytoplasmique, comprenant des éléments vésiculaires et tubulaires, est encore bien développé. Les mitochondries, nombreuses, sont petites et fines. On constate la présence de grains intensément osmiophiles, dont la taille et le nombre varient selon les cellules (Fig. 67). Les grains les plus petits se trouvent à l'intérieur d'une vésicule claire. Il convient de noter que certaines cellules, à cytoplasme plus sombre, renferment des mitochondries plus volumineuses.

2) Caractères morphologiques de l'explant corticosurrénalien associé *in vitro* avec un fragment de préhypophyse fraîchement prélevée.

L'association d'un fragment de corticosurrénale avec un explant de *pars distalis* aboutit en moins de 24 heures, à leur coalescence. Une membrane unicellulaire commune s'édifie autour des deux explants (Fig. 7).

D'une façon générale, les spongiocytes typiques ne paraissent pas bénéficier, de façon significative, de l'association avec un explant préhypophysaire : dès les premiers jours de culture, ils offrent comme chez le témoin, un noyau petit et hyperchromatique et un cytoplasme macrovacuolaire. Mais cette involution semble souvent ralentie par rapport à l'explant cultivé seul. L'examen au microscope électronique

montre plus fréquemment que dans l'explant témoin, des cellules de type spongiocytaire non dégénérées.

Les cellules glomérulaires conservent leur agencement habituel, mais elles sont hypertrophiées et leur cytoplasme présente des modifications ultrastructurales très caractéristiques (Fig. 68, 69 et 70).

La plupart des cellules ont un cytoplasme qui apparaît, par rapport au témoin, plus sombre. Cet aspect est dû essentiellement à l'accumulation de fines vésicules et de grains. L'appareil de Golgi est plus développé; ses cavités claires tranchent nettement sur le fond sombre du cytoplasme. Une image constamment observée est celle des vacuoles à contenu relativement dense, offrant un dépôt marginal excentrique intensément osmiophile (Fig. 68). Mais la modification la plus caractéristique concerne les mitochondries. Elles augmentent nettement de volume; cette augmentation est surtout manifeste dans le diamètre transversal. La matrice mitochondriale se densifie et les membranes mitochondriales transversales perdent l'orientation primitive.

A la suite de cet ensemble de transformations, les mitochondries vont présenter l'aspect tubulaire caractéristique de cellules glomérulaires adultes.

Il convient de préciser que l'on rencontre, parmi les cellules sombres, des cellules à cytoplasme plus clair. Mais là encore, les mitochondries présentent la même évolution ultrastructurale conduisant à l'aspect tubulaire.

3) Caractères morphologiques de l'explant corticosurrénalien associé en culture organotypique avec un explant préalablement cultivé.

Il convient de distinguer deux éventualités comme dans le cas de l'association avec le testicule :

- si l'explant préhypophysaire est préalablement cultivé sur le milieu semi-synthétique, l'explant corticosurrénalien présente les modifications que nous venons de décrire à propos d'un fragment de *pars distalis* fraîchement prélevé. Dans ce cas encore, la réaction du cortex surrénalien diminue notablement et devient même inconstante dès que la durée de culture préalable de la préhypophyse dépasse 5 à 8 jours. Elle s'étend alors selon un gradient décroissant d'intensité à partir de la région accolée contre l'explant pituitaire.
- si l'explant préhypophysaire est préalablement cultivé sur le mélange « milieu semi-synthétique-extrait de cerveau embryonnaire », son association avec un fragment corticosurrénalien n'entraîne pas de réactions significatives, c'est-à-dire réellement supérieures à celles que l'on observe avec un tissu hormonalement neutre tel que le myocarde embryonnaire.

4) *Propriétés fonctionnelles des explants préhypophysaires de Cobaye associés in vitro avec des fragments corticosurrénaliens de Hamster.* — Sur le même milieu nutritif, la corticosurrénale de Hamster *(Cricetus cricetus)* nouveau-né présente après quelques jours de culture une

constitution sensiblement identique à celle du cortex de Cobaye, à une différence près : les cellules de la zone fasciculée se prêtant, elles aussi, à une culture organotypique prolongée, la partie centrale de l'explant est composée de cellules provenant des zones glomérulaires et fasciculée. Cependant, la distinction entre les cellules de la glomérulaire et celles de la fasciculée devient plus difficile après une semaine de culture : les rapports entre les cellules de chaque zone ne sont plus aussi typiques qu'*in vivo* et les différences cytologiques décelables au microscope optique tendent à s'estomper.

La corticosurrénale de Hamster nouveau-né présente donc un intérêt tout particulier pour les recherches en culture organotypique. Toutefois, nous nous sommes heurtés à un obstacle limitant considérablement l'exploitation de ce matériel : le Hamster ordinaire *(Cricetus cricetus)* se reproduit rarement en captivité.

Nous avons pu néanmoins réaliser deux séries expérimentales.

Un fragment de cortex surrénalien fraîchement excisé chez un Hamster nouveau-né, a été mis en association *in vitro,* pendant 5 et 9 jours, avec un explant préhypophysaire de Cobaye adulte. Les résultats sont appréciés par comparaison avec des fragments de cortex surrénalien cultivés à titre de témoin.

Si l'explant préhypophysaire est fraîchement prélevé ou préalablement cultivé pendant 6 jours sur le milieu semi-synthétique, les spongiocytes s'hypertrophient légèrement en même temps que s'accentue l'image de cytoplasme finement vacuolisé. Or, une telle image correspond chez le Hamster ordinaire à un état d'activité hormonogène accrue du cortex surrénalien (Kayser et Petrovic, 1958; Kayser, 1961).

Si la durée de culture préalable de l'explant préhypophysaire est de 10 à 14 jours, les phénomènes réactionnels que présentent les spongiocytes deviennent à la fois discrets et inconstants.

5) *Discussion et conclusions.* – Il ressort de ces recherches que les cellules de la zone glomérulaire du cortex surrénalien provenant de fœtus de Cobaye réagissent à la préhypophyse, en culture organotypique, par une hypertrophie, par une accumulation de fines vésicules et de grains et, surtout, par une transformation tubulaire caractéristique des mitochondries. En d'autres termes, les cellules glomérulaires jeunes acquièrent, en présence de la préhypophyse, les caractères cytologiques de cellules glomérulaires adultes.

Nos recherches en culture organotypique sur le cortex surrénalien de fœtus de Cobaye ne nous ont pas permis d'observer la différenciation spongiocytaire de cellules glomérulaires, telle qu'elle a été mise en évidence par Schaberg (1961) dans ses expériences sur la corticosurrénale de Rat de 5 jours, associée *in vitro* avec la *pars distalis* ou bien soumise à une stimulation corticotrope.

L'involution en culture organotypique, – du moins dans les conditions de nos expériences, – de toutes les cellules de la zone fasciculée de corticosurrénale de Cobaye, illustre bien les difficultés d'interprétation d'une observation endocrinologique. Elle revêt même

la signification d'un appel à la prudence. L'apparente inaptitude des cellules de la zone fasciculée à réagir *in vitro* à la préhypophyse, justifie un principe méthodologique que nous avons toujours cherché à respecter : l'analyse des propriétés fonctionnelles d'une glande endocrine exige les conditions de culture organotypique assurant à l'explant son intégrité morphologique et une durée de survie pour le moins très supérieure aux délais que réclament les observations physiologiques.

Nos expériences d'association de préhypophyse et de cortex surrénalien de fœtus de Cobaye soulèvent encore d'autres difficultés. Il est, en effet, malaisé de répondre à la question de savoir quelle est parmi les hormones préhypophysaires celle qui est responsable des modifications de l'explant corticosurrénalien.

On ne saurait, dans l'état actuel de nos connaissances en endocrinologie, imputer simplement la maturation des cellules glomérulaires à une action de l'hormone corticotrope. L'intervention de l'hormone somatotrope paraît vraisemblable. Seule l'étude des effets des diverses hormones préhypophysaires isolées à l'état pur pourra apporter une solution définitive. Et une fois encore, nous constatons que l'activité fonctionnelle de la préhypophyse apparaît notablement réduite dès que la durée de culture dépasse une semaine et que ce phénomène s'accentue encore en présence d'un extrait de cerveau embryonnaire.

C'est finalement par les quelques expériences portant sur le cortex surrénalien de Hamsters nouveau-nés que nous avons recueilli la seule information sur l'activité adrénocorticotrope d'un explant préhypophysaire de Cobaye en culture organotypique. Il est, en effet, classique d'attribuer les modifications des cellules de la zone fasciculée à une action de l'hormone corticotrope. Or, il ressort de ces expériences que l'activité corticotrope est évidente aussi longtemps que la culture de la préhypophyse n'a été que de courte durée; après des délais de 10 et 14 jours cette activité diminue au point qu'elle ne se révèle plus que par des modifications cytologiques peu significatives des cellules corticosurrénaliennes. Il va de soi que des moyens d'observation plus raffinés permettront de préciser ces conclusions.

Nos résultats rejoignent les observations de Schaberg (1961) et de Martinovitch (1961) sur la persistance d'une activité corticotrope *in vitro;* elles ne sont pas en contradiction avec les conclusions de Guillemin (1956) selon lesquelles le maintien *in vitro* d'un fonctionnement corticotrope de degré élevé exige l'intervention de facteurs de stimulation tels que certains principes d'origine hypothalamique.

c) ASSOCIATION DE PRÉHYPOPHYSE AVEC LA THYROÏDE.

1) *Principe de l'expérience.* – Un fragment de préhypophyse de Cobaye adulte, fraîchement prélevé ou préalablement cultivé de 1 à 40 jours, est associé en culture organotypique sur le milieu anhormonal

pendant 6 heures à 3 jours avec un fragment de thyroïde fraîchement prélevée chez l'embryon de Poulet à des stades s'échelonnant de 6 jours et demi à 18 jours d'incubation.

En outre, nous avons associé *in vitro* la préhypophyse de Cobaye à la thyroïde de fœtus de même espèce.

2) *Relations préhypophyse-thyroïde chez l'embryon de Poulet.* – Nous retiendrons parmi les travaux consacrés aux corrélations entre la préhypophyse et la thyroïde ceux qui ont servi de point d'appui à nos propres recherches. On trouvera ailleurs une analyse des travaux sur la fonction thyroïdienne chez l'embryon des Vertébrés amniotes (Maraud et Stoll, 1961) et sur la naissance des relations préhypophyso-thyroïdiennes chez les embryons de vertébrés (Tixer-Vidal, 1958).

1) Données morphologiques sur la différenciation de la thyroïde de l'embryon de Poulet.

Les données chronologiques que l'on possède sur la différenciation de la thyroïde embryonnaire de Poulet sont nombreuses et assez concordantes (Tixier-Vidal, 1958; Maraud et Stoll, 1961). Vers le 6e jour d'incubation, les cellules de l'ébauche thyroïdienne sont disposées en cordons séparés par du mésenchyme. Les premiers signes d'activité sécrétoires tels qu'ils se manifestent par l'apparition de gouttelettes de colloïde sont décelables *in vivo* entre le 9e et le 11e jour d'incubation Dans les jours qui suivent, les cellules thyroïdiennes s'organisent en follicules : la glande acquiert son architecture caractéristique.

Stoll et ses collaborateurs (1958, 1959) ont fait une étude systématique de la différenciation de la thyroïde de l'embryon de Poulet au microscope électronique. Les caractères des α-cytomembranes leur permettent de distinguer au cours de la différenciation deux phases. Pendant la première phase, phase de différenciation, les α-cytomembranes sont rares et ne montrent généralement pas de signes d'activité élaboratrice. Cependant, les α-cytomembranes peuvent s'enrouler en forme de bulbe d'oignon autour d'une mitochondrie pour constituer ce que les auteurs appellent des « bulbes cytomembraneux » et qui, morphologiquement, sont analogues aux images décrites sous le nom de « Nebenkern »; dans ce cas les α-cytomembranes deviennent le siège des phénomènes d'élaboration. D'après les auteurs, les « bulbes cytomembraneux » passent dans les espaces intercellulaires où leur fonte donne naissance à des microvésicules dont le contenu PAS-positif correspond aux gouttes de colloïde de la microscopie optique. Pendant la deuxième phase, phase d'intégration, qui débute vers le 12e jour, les α-cytomembranes envahissent brusquement presque tout le cytoplasme et secrètent en abondance de la colloïde. C'est par l'apport de cette colloïde que vont grossir les microvésicules formées à partir des « bulbes cytomembraneux ».

2) Données expérimentales sur la différenciation de la thyroïde de l'embryon de Poulet.

L'étude du déterminisme de la différenciation thyroïdienne chez l'embryon de Poulet a nécessité la mise en œuvre de techniques très variées.

Dans le cadre d'une recherche d'ensemble sur le fonctionnement des glandes endocrines embryonnaires chez les Vertébrés, M. Aron (1931) conclut que les premiers signes histologiques d'une activité très discrète de la thyroïde embryonnaire chez le Poulet se manifestent vers le 12e jour d'incubation, mais ce n'est qu'à l'éclosion que ces signes s'accentuent. Afin de préciser ce qui incombe à l'hypophyse de l'embryon dans cet état de repos excrétoire de la thyroïde, M. Aron (1939) procède à des injections à l'intérieur de l'œuf vers le stade de 14 jours d'incubation, d'un extrait purifié de préhypophyse et montre que la thyroïde de l'embryon de Poulet est sensible, dès ce stade, à l'action de la thyréostimuline préhypophysaire. Dans ces conditions, M. Aron admet que l'hypophyse embryonnaire n'excrète pas la thyréostimuline avant la fin de l'incubation.

La méthode de destruction précoce de l'ébauche hypophysaire a abouti à des conclusions qui sont apparemment divergentes.

Wolff et Stoll (1937) et Stoll (1939) concluent que l'absence d'hypophyse est sans influence sur le développement de la thyroïde. Le recours à la microscopie électronique a permis à Stoll et ses collaborateurs (1958, 1959) de reconsidérer le rôle de l'hypophyse dans le fonctionnement de la thyroïde embryonnaire. Stoll et ses collaborateurs concluent, à la suite d'une étude des caractères ultrastructuraux de la thyroïde, que la phase dite d'intégration, qui débute vers le 12e jour d'incubation, doit son apparition précisément à l'entrée en jeu de l'hypophyse.

Fugo et Witschi (1938) et Fugo (1940) observent également, en l'absence d'hypophyse, une différenciation de la thyroïde, mais notent que la colloïde apparaît plus tardivement et en plus petites quantités.

Les résultats de Fugo sont étayés par les expériences de Martindale (1941). Cet auteur greffe les thyroïdes d'embryons normaux ou hypophysectomisés à des embryons normaux ou hypophysectomisés. Il en conclut que la thyroïde est capable d'autodifférenciation, mais qu'elle est soumise à la régulation hypophysaire dès le 11e jour au plus tard.

Du point de vue de nos propres recherches, les données expérimentales qui appellent une analyse plus détaillée sont celles recueillies en culture organotypique.

Carpenter (1942) cultive pendant 8 jours la thyroïde de l'embryon de Poulet de 8 jours. Il en ressort que la différenciation de la thyroïde *in vitro* ne diffère pas significativement de celle observée *in vivo*. Une étude de la fixation du radioiode est venue étayer cette conclusion (Carpenter et coll., 1954).

Pour Gonzales (1954), en revanche, les synthèses iodées dans un

explant thyroïdien ne sont normales que durant les deux premiers jours de culture, bien que le milieu nutritif comporte du plasma.

Gaillard (1954, 1955) cultive des thyroïdes d'embryons de Poulet de 8 jours et montre qu'elles sont sensibles à l'action d'un explant préhypophysaire de Coq ou à celle d'une préparation de thyréostimuline. Les expériences de Gaillard ont été reprises par sa collaboratrice Bakker-Sauer (1961). Cet auteur, non seulement confirme que la thyroïde d'embryons de Poulet de 6 jours et demi à 9 jours et demi est capable de former de la colloïde *in vitro,* mais encore démontre que l'élaboration de la colloïde est, dans ces conditions, à la fois plus précoce et plus importante. Une préparation de thyréostimuline, introduite dans le milieu de culture, stimule la formation de colloïde, mais son effet le plus marquant est de faire apparaître en quelques heures dans l'explant thyroïdien, des images lacunaires que l'auteur interprète comme des formations *intra*cytoplasmiques.

A en juger par les résultats de Carpenter (1942) et Gaillard (1953), la thyroïde embryonnaire de Poulet est capable d'autodifférenciation.

D'après Tixier-Vidal (1958), il convient de nuancer ces conclusions. En effet, Carpenter et Gaillard ont réalisé la culture de la thyroïde sur un milieu comportant un pourcentage important de plasma d'animal adulte, susceptible d'apporter de l'hormone thyréotrope. Tixier-Vidal (1958) a donc repris le problème du déterminisme de la différenciation de la thyroïde embryonnaire de Poulet en culture organotypique en faisant appel à un milieu anhormonal : le milieu de culture naturel dit standard de Wolff et Haffen (1952). Elle introduit cependant deux modifications : d'une part, elle prépare l'extrait à partir des embryons de 7 et non pas de 9 jours, et, d'autre part, elle augmente la proportion du jus embryonnaire.

Sur ce milieu, dépourvu d'hormone thyréotrope, Tixier-Vidal a réalisé une série d'expériences qui l'ont amenée à formuler un certain nombre de conclusions dont les plus importantes sont les suivantes : la thyroïde embryonnaire de Poulet devient sensible à la thyréostimuline au cours du 6e jour d'incubation; la thyroïde est capable d'une autodifférenciation limitée à partir du stade embryonnaire de 7 jours; l'hypophyse est capable de contrôler précocement l'activité fonctionnelle de la thyroïde, mais ne semble pas la déterminer à l'origine.

Les résultats de Tixier-Vidal obtenus *in vitro* (1958) sont par conséquent en accord avec ceux de Fugo (1940) obtenus *in vivo :* l'hypophyse embryonnaire est capable de contrôler l'activité fonctionnelle de la thyroïde; ce contrôle s'exerce réellement. Mais les recherches de Tixier-Vidal (1958) ont encore mis en évidence toute l'importance des facteurs trophiques dans les processus fonctionnels : un milieu plus riche en jus embryonnaire, le contact d'un tissu riche en oxydases, comme le muscle cardiaque, peuvent, à eux seuls, favoriser le fonctionnement de l'explant thyroïdien *in vitro.*

A l'aide de leur méthode des milieux synthétiques, Wolff, Haffen et Dieterlen (1961) ont cherché à déterminer quels facteurs nutritifs

généraux ou spécifiques, sont nécessaires à la différenciation thyroïdienne *in vitro*. Ces auteurs confirment d'abord la capacité d'autodifférenciation à partir du stade embryonnaire de 7 jours de la thyroïde explantée sur le milieu standard. Ils soulignent ensuite que la présence d'un organe associé *in vitro* favorise la différenciation thyroïdienne, mais que l'hypophyse ne se montre pas à ce titre plus active que d'autres organes : le rôle de l'organe associé serait d'apporter à la thyroïde en voie de différenciation des substances nutritives. Quant aux milieux synthétiques, la plupart d'entre eux ne se montrent pas suffisants à assurer l'autodifférenciation de l'explant thyroïdien. Seul un milieu synthétique contenant 21 acides animés à des concentrations assez fortes, a permis une autodifférenciation de l'explant thyroïdien.

Ajoutons encore qu'à la suite de leurs expériences de culture sur un milieu dépourvu d'hormones préhypophysaires, Garzicic et Anaf (1959) concluent que la thyroïde de Rat prélevée au stade fœtal de 16 jours est, elle aussi, capable d'autodifférenciation.

Nous avons vu dans l'association avec la thyroïde d'embryon de Poulet, prélevée aux divers stades de son développement, un procédé susceptible de servir de test dans l'étude des propriétés fonctionnelles d'explants préhypophysaires fraîchement prélevés ou préalablement cultivés. Quelques expériences réalisées avec la thyroïde fœtale de Cobaye n'ont eu pour but que d'étendre à un Mammifère les observations recueillies chez l'embryon de Poulet.

3) *Propriétés fonctionnelles des explants préhypophysaires associés in vitro avec la thyroïde embryonnaire de Poulet. – Conduite des expériences.* – L'explant préhypophysaire est cultivé en association sur le milieu anhormonal avec la thyroïde embryonnaire de Poulet. La culture en association a été faite sur des hypophyses fraîchement prélevées ou préalablement cultivées pendant 1 à 40 jours sur le milieu semi-synthétique et cela avec ou sans extrait de cerveau fœtal.

La durée d'association a varié de 6 heures à 3 jours, mais dans la plupart des cas elle était de 24 heures. La température de culture était de 37°C.

Les thyroïdes sont prélevées chez l'embryon de Poulet à des stades s'échelonnant de 6 jours et demi à 18 jours. Notre étude a porté plus particulièrement sur les stades de 6,5, 8, 9, 14 et 15 jours d'incubation. Nous avons choisi les stades qui représentent des étapes capitales au cours de la différenciation de la thyroïde embryonnaire de Poulet. Notre choix était guidé par les travaux de Carpenter (1942), de Gaillard (1953, 1954) et, surtout, de Tixier-Vidal (1958) sur le déterminisme de la différenciation de la thyroïde d'embryon de Poulet.

Le plan expérimental a été établi de telle sorte que les résultats puissent être valablement soumis à une analyse statistique, tant il est vrai que le degré de certitude de l'information obtenue par des techniques statistiques, même les plus raffinées, dépend principalement de la conduite des expériences.

L'association de la préhypophyse avec la thyroïde embryonnaire de

Poulet devait comporter une étude de la fixation du radioiode. Le but était de comparer, pour un stade embryonnaire donné, les résultats concernant les explants thyroïdiens cultivés seuls à ceux obtenus avec les explants cultivés en association avec la préhypophyse ou avec un autre organe. Parmi les multiples facteurs expérimentaux dont les effets sont identiques dans les différentes séries, il en est un qui risque d'être systématique; il s'agit du volume de l'explant, facteur d'ailleurs relativement facile à contrôler. Aussi avons-nous procédé de la façon suivante : chaque lobe thyroïdien est coupé en deux moitiés, l'une servant de témoin, l'autre étant associée à divers organes. Chaque catégorie expérimentale ayant comporté de nombreux échantillons, les différences de volume liées aux variations individuelles de la taille du lobe thyroïdien et à son découpage deviennent négligeables. Cependant, pour compléter nos effectifs, nous avons introduit d'autres demi-thyroïdes dans les expériences d'association.

D'autres problèmes méthodologiques se posaient encore. Ainsi, la composition de l'extrait de cerveau fœtal, du sérum, des différentes solutions synthétiques, offrait certainement des fluctuations. Pour éliminer toute influence systématique de ces facteurs, nous avons tenu à réaliser avec un même milieu nutritif toutes les modalités expérimentales (culture de thyroïde seule, culture de thyroïde avec le myocarde, culture de thyroïde avec la préhypophyse, etc.). Dans ces conditions, les effets qui résultent de multiples combinaisons de facteurs non-contrôlés se manifestent au hasard.

A la fin d'une expérience, les explants d'une catégorie ont été séparés en plusieurs groupes : les uns étaient fixés en vue de l'étude morphologique, les autres étaient destinés à l'étude du métabolisme iodé.

Nous exposerons successivement les résultats de l'étude morphologique et ceux de l'étude physiologique.

Etude morphologique

Pour apprécier la manière dont réagit la thyroïde à l'explant préhypophysaire, nous avons cherché à réunir les données de la microscopie optique et de la microscopie électronique. Les images morphologiques varient au cours de la différenciation de la thyroïde, mais les éléments morphologiques pouvant servir de critère sont toujours les mêmes.

Le produit d'élaboration spécifique d'une glande constitue, évidemment, un premier critère d'appréciation de son activité fonctionnelle. Nous avons donc toujours cherché à mettre en évidence la colloïde, son apparition ou sa résorption. C'est là un critère dont la valeur est indiscutable, mais qui ne reflète qu'assez grossièrement l'activité fonctionnelle de la thyroïde. Positif, le test de la colloïde est valable; négatif, il doit être remplacé par des tests plus fins.

Une fois de plus, la microscopie électronique constitue un outil très précieux : elle permet de mettre en évidence des modifications

ultrastructurales caractéristiques d'une activation fonctionnelle. Nous avons ainsi été amené à étudier les caractères ultrastructuraux des explants thyroïdiens prélevés à divers stades de développement embryonnaire et cultivés seuls ou en association avec la préhypophyse de Cobaye adulte.

Enfin, lorsqu'il s'agissait des stades plus évolués, nous avons cherché à évaluer la hauteur de l'épithélium folliculaire.

Les résultats seront exposés selon le stade de développement de la thyroïde au moment de l'explantation. On décrira plus loin les caractères qui nous ont servi de critère pour apprécier l'intensité de la réponse.

Nous n'avons pas tenu compte dans ce tableau des délais d'observation. Cette manière de faire est justifiée puisque la durée de culture a été de 24 heures dans la presque totalité de nos expériences. Dans les rares cas où la durée a été différente, l'intensité de la réponse n'a pas varié significativement en fonction du temps.

Les tableaux III à VII des pages suivantes résument les principales modalités expérimentales, ainsi que les résultats obtenus.

1) Association de la préhypophyse de Cobaye avec la thyroïde explantée aux stades de 6 jours et demi et de 7 jours d'incubation. –

1) L'explant thyroïdien prélevé au stade de 6 jours et demi conserve *in vitro* sa structure d'origine dans la plupart des cas, qu'il soit cultivé seul ou en association avec le myocarde, le mésonéphros ou le poumon embryonnaire : il est constitué exclusivement de cordons cellulaires. Dans quelques cas cependant, il présente, après 24 à 48 heures de culture, de rares et fines gouttelettes de colloïde PAS-positive. et Gomori-positive. Prélevé chez un embryon de 7 jours, l'explant renferme des gouttelettes de colloïde dans un pourcentage de cas déjà important.

L'étude au microscope électronique de tels explants (Fig. 56) confirme ces données; elle révèle, en plus, l'existence de quelques petits espaces intercellulaires formés par le mécanisme d'écartement des membranes cytoplasmiques et qui échappent à l'examen optique en raison de leur très faible taille.

2) De nombreuses lacunes intercellulaires à contenu chromophobe (Fig. 9) apparaissent dans l'explant thyroïdien cultivé en association avec un fragment préhypophysaire. Cette image histologique s'est révélée absente dans les cultures-témoins.

24 à 48 heures après l'association, l'explant thyroïdien renferme de la colloïde formant des flaques intercellulaires plus nombreuses et plus grosses que dans les cultures-témoins, tandis que les lacunes chromophobes tendent à disparaître.

Il convient d'ajouter que l'explant thyroïdien d'un embryon de 6 jours et demi réagit à la préhypophyse surtout par la formation de

TABLEAU III

Thyroïde explantée à 6 jours et demi

1) Expériences de contrôle	Nombre de cas
th seule	73
th et my	29
th et mn	13
th et pm	8

2) Expériences d'association avec la préhypophyse fraîchement prélevée	Nombre de cas et intensité de la réponse	
th et HB fp	44	+++ (20) ++ (17) + (7)
th et HM fp	31	+++ (12) ++ (7) + (8)
th et HA fp	19	+ (3) + (6) 0 (10)

3) Expériences d'association avec la préhypophyse préalablement cultivée	Nombre de cas et intensité de la réponse			
	sur le milieu semi-synthétique		sur le mélange « milieu semi-synthétique-extrait de cerveau fœtal »	
th et H B pc 6 h	12	+++ (10) + (2)		
th et H m pc 6 h	8	+++ (7) ± (1)		
th et H A pc 6 h	6	+ (3) 0 (3)		
th et H B pc 12 h	10	+++ (7) ++ (3)	8	+++ (5) ++ (3)
th et H M pc 12 h	4	+++ (3) ++ (1)		
th et H A pc 12 h	7	+ (2) 0 (5)	5	+ (3) 0 (2)

th et H B pc 1	28	+++ (17) ++ (8) + (3)	12	+++ (8) ++ (4)
th et H M pc 1	12	+++ (11) 0 (1)	9	++ (7) 0 (2)
th et H A pc 1	12	+ (5) 0 (7)	8	+ (3) 0 (5)
th et H B pc 2	14	+++ (8) ++ (6)	7	+++ (4) ++ (3)
th et H M pc 2	4	++ (3) + (1)	8	+++ (6) + (2)
th et H A pc 2	5	+ (2) 0 (3)	2	+ (1) 0 (1)
th et H B pc 3	17	+++ (13) ++ (4)	10	++ (6) + (4)
th et H M pc 3	6	+++ (2) + (4)	12	+++ (6) ++ (6)
th et H A pc 3	4	0 (4)	3	+ (1) 0 (2)
th et H B pc 4	9	+++ (3) ++ (5) + (1)		
th et H M pc 4	12	++ (10) 0 (2)		
th et H A pc 4	5	0 (5)		
th et H B pc 5	13	+++ (9) + (4)		
th et H M pc 5	10	+ (8) 0 (2)		
th et H A pc 5	7	+ (2) 0 (5)		
th et H B pc 6	10	++ (8) + (2)		
th et H M pc 6	6	+ (5) 0 (1)		
th et H A pc 6	9	+ (2) 0 (7)		
th et H B pc 10	7	++ (3) + (4)		
th et H M pc 10	5	+ (5)		

th et H A pc 10	6	+ (1) 0 (5)		
th et H B pc 15	9	+ (7) 0 (2)	7	+ (3) ± (4)
th et H M pc 15	8	+ (7) 0 (1)		
th et H A pc 15	4	0 (4)		
th et H B pc 20	12	+ (12)	9	± (8) 0 (1)
th et H M pc 20	13	+ (9) 0 (4)	10	± (7) 0 (3)
th et H A pc 20	6	0 (6)	2	0 (2)
th et H B pc 21	10	+ (9) 0 (1)		
th et H M pc 21	4	+ (4)		
th et H A pc 21	3	0 (3)		
th et H B pc 37	16	+ (14) 0 (2)		
th et H M pc 37	3	+ (2) 0 (1)		
th et H A pc 37	7	0 (7)		
th et H B pc 40	11	+ (8) 0 (3)		
th et H M pc 40	5	+ (2) 0 (3)		
th et H A pc 40	4	0 (4)		

lacunes chromophobes. Ce n'est qu'à partir du stade d'incubation de 7 jours que l'explant thyroïdien élabore la colloïde d'une façon intense.

L'étude de l'explant thyroïdien au microscope électronique montre que les lacunes chromophobes se forment par écartement des membranes de cellules adjacentes; il s'agit donc d'une structure *intercellulaire*. Les membranes cellulaires qui bordent ces cavités présentent des microvillosités; celles-ci s'effacent lorsque la lacune augmente de taille. Le contenu des lacunes est, en général, clair; seules quelques rares cavités offrent un contenu d'une très faible densité et légèrement floconneux, PAS-positif sur coupes semi-fines. L'action de la préhypophyse entraîne d'autres modifications ultrastructurales de l'explant thyroïdien (Fig. 57 et 58) : les vésicules du réticulum cytoplasmique évoluent en sacs ergastoplasmiques; les structures golgiennes se loca-

TABLEAU IV

Thyroïde explantée à 7 jours

1) Expériences de contrôle	Nombre de cas
th seule	28
th et my	15
th et mn	8
th et pm	11

2) Expériences d'association avec la préhypophyse fraîchement prélevée	Nombre de cas et intensité de la réponse
th et H B fp	14 +++(9) ++(5)
th et H M fp	16 +++(12) ++(4)
th et H A fp	7 +(3) 0 (4)

3) Expériences d'association avec la préhypophyse préalablement cultivée Modalité expérimentale	Nombre de cas et intensité de la réponse	
	sur le milieu semi-synthétique	sur le mélange « milieu semi-synthétique-extrait de cerveau fœtal »
th et H B pc 12 h	13 +++(8) ++(5)	
th et H M pc 12 h	10 +++(7) ++(3)	
th et H A pc 12 h	5 +(1) 0 (4)	
th et H B pc 1	8 +++(5) ++(3)	
th et H M pc 1	6 +++(5) +(1)	
th et H A pc 1	4 +(1) 0 (3)	
th et H B pc 2	8 +++(5) ++(3)	
th et H M pc 2	8 ++(6) +(2)	

th et H A pc 2	3	+ (1) 0 (2)		
th et H B pc 3	5	+ + + (4) + + (1)	6	+ + (4) + (2)
th et H M pc 3	7	+ + + (3) + (4)	8	+ + + (5) + + (3)
th et H A pc 3	3	0 (3)	4	+ (1) 0 (3)
th et H B pc 5	8	+ + (6) + (2)		
th et H M pc 5	11	+ + (9) 0 (2)		
th et H A pc 5	4	+ (1) 0 (3)		
th et H B pc 10	12	+ + (9) + (3)		
th et H M pc 10	10	+ + (7) 0 (3)		
th et H A pc 10	4	0 (4)		
th et H B pc 21	6	+ (5) 0 (1)		
th et H M pc 21	5	+ (5)		
th et H A pc 21	3	0 (3)		
th et H B pc 37	7	+ (5) 0 (2)	5	0 (5)
th et H M pc 37	8	+ (7) 0 (1)	3	+ (1) 0 (2)
th et H A pc 37	4	0 (4)	2	0 (2)

lisent dans la région du cytoplasme bordant une lacune intercellulaire.

La formation de la colloïde intercellulaire apparaît donc liée à ce stade embryonnaire à la seule activité secrétoire de l'ergastoplasme.

Trois facteurs sont susceptibles d'influer sur ces modifications de l'explant thyroïdien :

1) la durée de culture préalable de l'explant hypophysaire
2) la nature du milieu nutritif ayant servi à la culture préalable de la préhypophyse
3) l'origine topique dans la glande *in situ* de l'explant préhypophysaire

TABLEAU V

Thyroïde explantée à 8 jours

1) Expériences de contrôle	Nombre de cas
th seule	18
th et my	13

2) Expériences d'association avec la préhypophyse fraîchement prélevée	Nombre de cas et intensité de la réponse
th et H B fp	15 : +++(6), ++(7), +(2)
th et H M fp	16 : +++(6), ++(8), +(1), 0(1)
th et H A fp	5 : +(2), 0(3)

3) Expériences d'association avec la préhypophyse préalablement cultivée Modalité expérimentale	Nombre de cas et intensité de la réponse	
	sur le milieu semi-synthétique	sur le mélange « milieu semi-synthétique-extrait de cerveau fœtal »
th et H B pc 1	5 : +++(4), ++(1)	
th et H M pc 1	6 : +++(4), 0(2)	
th et H A pc 1	3 : +(1), 0(2)	
th et H B pc 2	6 : +++(5), ++(1)	
th et H M pc 2	7 : ++(5), +(2)	
th et H A pc 2	4 : +(2), 0(2)	
th et H B pc 3	8 : +++(6), ++(2)	6 : +++(4), +(2)

th et H M pc 3	9	+++ (5) + (4)	8	+++ (3) ++ (5)
th et H A pc 3	3	+ (1) 0 (2)	5	+ (1) 0 (4)
th et H B pc 5	7	+++ (2) ++ (5)		
th et H M pc 5	4	+ + (3) 0 (1)		
th et H A pc 5	2	+ (1) 0 (1)		
th et H B pc 21	9	+ (8) 0 (1)	8	± (5) 0 (3)
th et H M pc 21	7	+ (5) 0 (2)		
th et H A pc 21	2	0 (2)		

1) - L'intensité des modifications décrites de l'explant thyroïdien décroît avec la durée de culture préalable de la préhypophyse. Si cette durée ne dépasse pas 6 jours, la réaction thyroïdienne est très forte (Fig. 9 et 11). Ce délai une fois dépassé, les modifications thyroïdiennes deviennent plus discrètes, mais restent évidentes, par rapport aux témoins, même après 37 et 40 jours (Fig. 10 et 12).

2) - Si l'explant préhypophysaire est cultivé avant l'association, sur un milieu semi-synthétique additionné d'un extrait de cerveau fœtal, les phénomènes réactionnels de l'explant thyroïdien deviennent très difficiles à déceler (Fig. 13).

3) - Les effets les plus nets ont été observés avec des explants excisés dans la région toute antérieure de la glande pituitaire, la seule à posséder chez le Cobaye, selon Rebel et Marescaux (1958) des cellules colorées à la fuchsine-paraldéhyde de Gomori (Fig. 9, 10, 11, 12 et 14). Cependant, l'ensemble de nos résultats montre que des explants excisés plus en arrière – dans la partie de la glande pituitaire dépourvue *in situ* de cellules colorées à la fuchsine-paraldéhyde – sont néanmoins capables de stimuler l'explant thyroïdien. Sont sans effet sur l'explant thyroïdien les explants excisés dans une étroite zone postéro-latérale de la glande pituitaire où l'unique élément chromophile est constitué par des cellules acidophiles (Fig. 8).

2) Association de la préhypophyse de Cobaye avec la thyroïde explantée du stade de 8 jours d'incubation. – 1) L'explant thyroïdien cultivé seul est constitué de cellules riches en grains de Palade libres et en fines vésicules et pauvres en structures ergastoplasmiques. Les

TABLEAU VI

Thyroïde explantée à 9 jours

1) Expériences de contrôle	Nombre de cas
th seule	17
th et my	10

2) Expériences d'association avec la préhypophyse fraîchement prélevée	Nombre de cas et intensité de la réponse
th et H B fp	12 : +++ (9), ++ (2), + (1)
th et H M fp	13 : +++ (6), ++ (5), + (2)
th et H A fp	4 : + (2), 0 (2)

3) Expériences d'association avec la préhypophyse préalablement cultivée Modalité expérimentale	Nombre de cas et intensité de la réponse	
	sur le milieu semi-synthétique	sur le mélange « milieu semi-synthétique-extrait de cerveau fœtal »
th et H B pc 1	8 : +++ (4), ++ (3), + (1)	
th et H M pc 1	6 : +++ (4), + (2)	
th et H A pc 1	3 : + (1), 0 (2)	
th et H B pc 2	6 : +++ (4), ++ (2)	
th et H M pc 2	7 : +++ (4), ++ (2), + (1)	
th et H A pc 2	4 : + (1), 0 (3)	
th et H B pc 3	10 : +++ (6), ++ (2), + (2)	

th et H M pc 3	7	+++ (5) + (2)		
th et H A pc 3	2	0 (2)		
th et H B pc 5	6	++ (4) + (2)		
th et H M pc 5	7	+ (3) 0 (4)		
th et H A pc 5	2	+ (1) 0 (1)		
th et H B pc 19	16	+ (14) 0 (2)	12	+ (2) ± (10)
th et H M pc 19	10	+ (6) 0 (4)	7	+ (4) + (3)
th et H A pc 19	4	0 (4)		
th et H B pc 21	4	+ (3) 0 (1)		
th et H M pc 21	5	+ (5)		
th et H A pc 21	2	0 (2)		

éléments golgiens sont répartis dans tout le cytoplasme. Les contours cellulaires apparaissent irréguliers et enchevêtrés. On trouve par-ci, par-là quelques petites cavités intercellulaires à contenu clair (Fig. 59).

2) A la suite de l'association avec un explant préhypophysaire, les cellules thyroïdiennes sont le siège d'un développement important et rapide de sacs ergastoplasmiques. Ceux-ci se forment toujours au voisinage de mitochondries. On assiste à la formation de nombreuses cavités intercellulaires à contenu floconneux assez dense, PAS-positif sur coupes semi-fines. Les éléments golgiens sont nettement localisés dans la région du cytoplasme avoisinant la cavité colloïdale. Une fois encore, nous assistons à la formation simultanée d'ergastoplasme et de cavités remplies de colloïde (Fig. 60). Il convient de préciser que l'on peut déjà observer, à ce stade, les petits granules denses et les corps sphériques plus volumineux, assimilables à des gouttelettes de colloïde; mais ils n'existent pas en quantité appréciable et, fait essentiel, l'accumulation de colloïde extracellulaire peut se faire en leur absence. De telles images sont pour nous l'expression des processus complexes de ségrégation et de transport de produits résorbés à partir de la cavité folliculaire. Les mitochondries perdent leur forme allongée et deviennent plus trapues. Les contours cellulaires tendent à se régulariser (Fig. 60).

Dans ce cas également, les explants préhypophysaires excisés dans la région « basophile » et « mixte » se sont révélés plus actifs que ceux

TABLEAU VII

Thyroïde explantée à 14 jours

1) Expériences de contrôle	Nombre de cas
th seule	31
th et my	17
th et mn	9
th et en	18

2) Expériences d'association avec la préhypophyse fraîchement prélevée	Nombre de cas et intensité de la réponse
th et H B fp	22 +++(16) ++(6)
th et H M fp	18 +++(15) ++(1) 0 (2)
th et H A fp	7 +(2) 0 (5)

3) Expériences d'association avec la préhypophyse préalablement cultivée Modalité expérimentale	Nombre de cas et intensité de la réponse	
	sur le milieu semi-synthétique	sur le mélange « milieu semi-synthétique-extrait de cerveau fœtal »
th et H B pc 1	12 +++(7) ++(5)	
th et H M pc 1	10 +++(8) 0 (2)	
th et H A pc 1	5 +(2) 0 (3)	
th et H B pc 2	6 +++(5) +(1)	8 +++(5) +(3)
th et H M pc 2	7 ++(5) +(2)	10 +++(4) ++(6)
th et H A pc 2	4 +(1) 0 (3)	2 +(1) 0 (1)
th et H B pc 3	9 +++(5) ++(3) 0 (1)	5 +++(2) ++(3)

th et H M pc 3	11	+ + + (6) 0 (5)	5	+ + + (3) + + (2)
th et H A pc 3	4	+ (1) 0 (3)	2	0 (2)
th et H B pc 4	6	+ + + (4) + + (2)		
th et H M pc 4	7	+ + + (3) 0 (4)		
th et H A pc 4	3	0 (3)		
th et H B pc 5	8	+ + + (6) + + (2)		
th et H M pc 5	8	+ + (7) 0 (1)		
th et H A pc 5	4	+ (1) 0 (3)		
th et H B pc 6	8	+ (2) ± (6)	6	+ (4) 0 (2)
th et H M pc 6	7	+ (5) 0 (2)	8	+ (3) 0 (5)
th et H A pc 6	4	+ (1) 0 (3)	3	0 (3)
th et H B pc 13	12	+ (2) ± (7) 0 (3)		
th et H M pc 13	8	+ (6) 0 (2)		
th et H A pc 13	3	+ (1) 0 (2)		
th et H B pc 19	10	+ (8) ± (2)		
th et H M pc 19	8	+ (6) 0 (2)		
th et H A pc 19	2	0 (2)		
th et H B pc 20	14	+ + (1) + (11) 0 (2)		
th et H M pc 20	6	+ (4) 0 (2)		
th et H A pc 20	2	0 (2)		

th et H B pc 21	8	+ (3) ± (5)	12	+ (2) ± (10)
th et H M pc 21	9	+ (6) 0 (3)	11	± (8) 0 (3)
th et H A pc 21	3	0 (3)	4	0 (4)
th et H B pc 23	9	+ + (2) + (6) 0 (1)		
th et H M pc 23	4	+ (2) 0 (2)		
th et H A pc 23	2	0 (2)		
th et H B pc 26	11	+ + (1) + (8) 0 (2)		
th et H M pc 26	5	+ (4) 0 (1)		
th et H A pc 26	2	0 (2)		
th et H B pc 36	12	+ (12)		
th et H M pc 36	7	+ (5) 0 (2)		
th et H A pc 36	4	0 (4)		

th : thyroïde
my : myocarde embryonnaire
mn : mésonéphros
pm : poumon embryonnaire
en : encéphale
H : préhypophyse
B : zone « basophile »
M : zone « mixte »
A : zone « acidophile »
fp : fraîchement prélevé
pc : préalablement cultivé (en jours)

L'intensité de la réponse est évaluée par comparaison avec l'explant thyroïdien témoin. Par définition, nous avons désigné la réponse la plus forte par + + +.

découpés dans la zone postéro-latérale de la glande *in situ*. La réaction que présente l'explant thyroïdien devient plus faible si l'explant préhypophysaire a été cultivé assez longtemps avant l'association.

3) Association de la préhypophyse de Cobaye avec la thyroïde explantée au stade de 9 jours d'incubation. – 1) L'explant thyroïdien cultivé seul est constitué de cellules dont les interdigitations tendent à disparaître. Les cavités intercellulaires sont quelquefois plus nombreuses qu'au stade de 8 jours. Les cellules sont assez riches en petites vésicules ergastoplasmiques, dont quelques-unes commencent à s'allonger (Fig. 61). La proportion des grains de Palade libres diminue par rapport à ceux fixés sur les membranes.

2) L'association d'un explant thyroïdien avec un fragment de préhypophyse entraîne des modifications ultrastructurales plus marquées qu'au stade de 8 jours. Les contours cellulaires deviennent plus réguliers : les interdigitations disparaissent. Les cavités intercellulaires sont plus nombreuses et leur contenu plus dense. Les parois des cellules bordant une cavité sont unies par des désmosomes localisés au pôle apical. Le cytoplasme est rempli de vésicules et de sacs ergastoplasmiques (Fig. 62). Les mitochondries deviennent plus trapues et plus denses Les éléments golgiens tendent à se grouper dans une zone juxtanucléaire. La région apicale du cytoplasme présente des images de pinocytose.

Un explant préhypophysaire exerce des effets d'autant plus intenses que son origine topique dans la glande *in situ* est plus antérieure.

Si l'explant préhypophysaire est cultivé avant l'association, la réaction thyroïdienne est moins intense, mais encore évidente : on note un développement de l'ergastoplasme allant de pair avec la formation de cavités à contenu colloïde.

4) Association de la préhypophyse de Cobaye avec la thyroïde explantée aux stades de 14 jours et de 15 jours d'incubation. – 1) Prélevé à ce stade et cultivé seul, l'explant thyroïdien offre l'image d'une glande mûre. Les cellules sont disposées en follicules. Elles sont plus ou moins aplaties et leur aspect est comparable à celui des cellules en repos fonctionnel dans la glande *in situ* (Fig. 64). Il convient de noter qu'à ce stade, l'explant thyroïdien cultivé seul, offre une hétérogénéité portant sur la taille et la structure des cellules, sur le diamètre des cavités intercellulaires et sur la densité de la colloïde. Les cellules sont plus ou moins riches en sacs ergastoplasmiques. On observe dans le cytoplasme, en regard de la zone de Golgi, quelques vacuoles de résorption et des microvésicules de pinocytose. Les cavités folliculaires sont d'une façon générale assez grandes et la colloïde plus ou moins dense.

2) Associé à un explant préhypophysaire, l'explant thyroïdien présente des modifications complexes (Fig. 55 et 56). La cellule perd sa

forme aplatie et devient souvent très volumineuse. En même temps, la taille des cavités folliculaires diminue fortement.

L'action de l'explant préhypophysaire s'exerce, d'une part, sur le développement des structures ergastoplasmiques, d'autre part, sur les processus de résorption. L'hétérogénéité des images ultrastructurales s'accentue notablement. Certaines cellules sont criblées de cavités ergastoplasmiques arrondies, renfermant une substance floconneuse dense : cette accumulation plus importante de matériel élaboré marque une intensification de la fonction sécrétoire (Fig. 56). D'autres cellules offrent des images de résorption active (Fig. 55) : de fines vésicules de pinocytose, des petits granules denses et des corps sphériques plus volumineux apparaissent au pôle apical de la celule et se répandent ensuite dans le reste du cytoplasme. Les grosses vacuoles, formées par l'invagination de la membrane apicale, traduisant un processus de résorption *massive,* quasi-macrophagique de colloïde. Les microvillosités sont plus nombreuses que dans l'explant thyroïdien témoin. Les structures ergastoplasmiques et les mitochondries apparaissent refoulées de part et d'autre des zones de passage du matériel résorbé. A un stadè un peu plus avancé, on retrouve les grosses vacuoles de résorption au pôle basal de la cellule, où elles tendent à confluer.

5) Association de la préhypophyse de Cobaye avec la thyroïde de fœtus de Cobaye. – Ces expériences ont eu pour seul but de contrôler sur un Mammifère nos observations recueillies chez un embryon d'Oiseau.

Un fragment thyroïdien de fœtus de Cobaye de 8 cm et demi (du vertex au coccyx) a été associé pendant 36 heures sur le milieu anhormonal avec la préhypophyse de Cobaye adulte, fraîchement prélevée ou préalablement cultivée pendant 6 et 19 jours sur le milieu semi-synthétique.

L'examen histologique montre que les vésicules thyroïdiennes situées au voisinage de l'explant préhypophysaire présentent un épithélium plus élevé et une colloïde moins abondante (Fig. 14). Or, c'est là une image qui traduit des effets de stimulation (Aron, 1934). L'explant de *pars distalis* cultivé préalablement pendant 19 jours s'est montré bien moins actif.

6) Association de la préhypophyse de Rat avec la thyroïde embryonnaire de Poulet. – L'on admet que la thyroïde du Rat est plus active que celle du Cobaye et que son degré d'activité est lié au contenu de la préhypophyse en thyréostimuline (Loeb, 1932; Kunkel et Loeb, 1935; Adams, 1946), bien que les travaux de C. Aron et ses collaborateurs (1958) mettent en doute ce dernier point. Ces constatations nous ont amené à associer en culture organotypique la préhypophyse de Rat avec la thyroïde embryonnaire de Poulet.

Les résultats déjà acquis permettent de conclure que les effets observés dans la thyroïde embryonnaire de Poulet peuvent réellement être plus accusés avec la préhypophyse de Rat qu'avec celle de Co-

baye. Deux restrictions s'imposent toutefois : 1) cette différence en faveur de la préhypophyse de Rat s'est révélée surtout nette en hiver. En été, les effets observés pouvaient même être inférieurs à ceux suscités par la glande pituitaire de Cobaye; 2) cette différence nous a semblé disparaître dès que la durée de culture préalable de la préhypophyse a excédé quelques jours.

7) Discussion et conclusions. – L'explant thyroïdien d'embryon de Poulet aux stades de 6 jours et demi et de 7 jours présente en culture organotypique 6 à 24 heures après son association avec la préhypophyse de Cobaye adulte, de nombreuses lacunes intercellulaires chromophobes. Une telle image histologique s'observe également dans l'explant thyroïdien cultivé sur un milieu nutritif auquel on a incorporé une préparation de thyréostimuline (Bakker-Sauër, 1961). Il y a là un premier argument qui plaide en faveur d'une action thyréostimulante spécifique de l'explant préhypophysaire.

Il convient de préciser que Bakker-Sauër a interprété ces lacunes chromophobes comme des formations intracytoplasmiques. Nos recherches au microscope électronique montrent que les lacunes se forment par écartement progressif des membranes cellulaires adjacentes. La nature intercellulaire des lacunes est, par conséquent, démontrée. Celles-ci semblent ainsi préfigurer les phénomènes liés à la formation des cavités de colloïde.

La formation des lacunes intercellulaires est précédée d'un développement de structures ergastoplasmiques et golgiennes. Il en est de même pour la formation de colloïde. Son apparition dans les cavités intercellulaires néoformées va de pair avec le développement de sacs ergastoplasmiques, ainsi que le montrent nos expériences d'association de la préhypophyse avec la thyroïde prélevée aux divers stades d'incubation.

La stimulation préhypophysaire s'exerce à la fois sur le développement de l'ergastoplasme (à tous les stades étudiés) et sur les processus de résorption (surtout nette sur les explants de 14 jours d'incubation). Les différences réactionnelles qui se manifestent entre les explants thyroïdiens prélevés aux divers stades d'incubation doivent être imputées aux degrés de maturation croissants des glandes, ayant été mises en culture. Il en ressort que l'action de la préhypophyse adulte sur la thyroïde embryonnaire ne fait qu'actualiser des potentialités fonctionnelles ou intensifier des processus déjà existants, sans intervenir, apparemment, sur la différenciation ontogénétique de la glande. En effet, pour nous, cette première apparition de colloïde traduit le déclenchement des processus élaborateurs spécifiques d'un organe biologiquement déjà différencié. Car, la différenciation elle-même – problème crucial pour qui analyse les mécanismes – est un phénomène du domaine de la biologie moléculaire, donc « prémorphologique ».

Nos expériences en culture organotypique rejoignent d'autres observations faites *in vitro* (Gaillard, 1953, 1954, 1955; Tixier-Vidal,

1958; Wolff, Haffen et Dieterlen, 1960) et *in vivo* (M. Aron, 1931, 1939; Maraud et Stoll, 1961).

Les effets de stimulation sur l'explant thyroïdien sont obtenus par l'action d'un fragment découpé dans la région antérieure de la préhypophyse. Les fragments provenant d'une étroite zone postéro-latérale de la *pars distalis* restent pratiquement sans effet.

Nous voyons dans cette observation un deuxième argument en faveur d'une action thyréostimulante spécifique de l'explant préhypophysaire. En effet, la région postéro-latérale de la préhypophyse est dépourvue, chez le Cobaye (Rebel et Marescaux, 1958) de cellules δ réputées thyréostimulantes (Purves et Griesbach, 1951a; Halmi, 1952; Herlant, 1956, 1958, 1961; Rebel et Marescaux, 1958; Racadot, 1959).

Les explants excisés dans une région de la glande pituitaire, dépourvue *in situ* de cellules fuchsine-paraldéhyde-positives, sont cependant doués en culture d'aptitudes thyréostimulantes évidentes. La préhypophyse renferme donc des cellules capables d'élaborer la thyréostimuline bien qu'*in situ* elles ne soient pas mises en évidence par la fuchsine-paraldéhyde dans les conditions normales. Par ailleurs les cellules indifférenciées provenant de la zone postéro-latérale de la glande *in situ* ne se sont pas transformées en cellules thyréostimulantes dans les conditions de la culture organotypique.

Si un explant préhypophysaire, en l'absence de cellules thyréotropes ne stimule plus de façon significative les processus d'élaboration et de résorption thyroïdiens, cela n'exclut pas l'éventualité d'une action non spécifique d'autres organes. Ainsi le myocarde embryonnaire stimule en culture organotypique la colloïdo-genèse de la thyroïde précisément aux stades de 6 jours et demi et de 7 jours d'incubation (Tixier-Vidal, 1958; Wolff, Haffen et Dieterlen, 1961), mais, comme l'a montré Tixier-Vidal (1958), la colloïdo-genèse s'intensifie encore en présence d'un explant préhypophysaire d'embryon de Poulet. Nous verrons que nos observations avec le radioiode ont confirmé cette façon de voir.

L'étude morphologique de l'explant thyroïdien cultivé en association avec un explant préhypophysaire montre que ce dernier conserve *in vitro* une activité thyréostimulante, celle-ci est intense si la durée de la culture préalable de *pars distalis* n'excède pas quelques jours, mais elle est encore appréciable après des délais allant jusqu'à 40 jours, à condition que le milieu nutritif ne comporte pas une trop forte proportion d'un extrait embryonnaire.

Etude physiologique

Les résultats obtenus par l'étude morphologique ont été complétés par une exploration fonctionnelle.

La fonction thyroïdienne étant étroitement liée au métabolisme de l'iode, une étude dynamique de cette glande vise principalement à explorer les mouvements de ce métalloïde.

Nous avons utilisé en vue de cette exploration le radioiode comme traceur.

Nos recherches ont porté sur le radioiode intrathyroïdien. Dans un premier temps, nous avons cherché à évaluer les quantités de radioiode fixées par un explant thyroïdien cultivé seul ou en association avec la préhypophyse ou le myocarde. Dans un deuxième temps, nous avons essayé de mettre en évidence dans le tissu thyroïdien cultivé les produits organiques des synthèses iodées : cette étude devait révéler la signification des éventuelles modifications décelées par l'étude de la fixation du radioiode.

Pour juger du degré d'activité de la thyroïde, il eut fallu encore déterminer les quantités d'hormones déversées dans le milieu de culture. Une telle étude est en cours.

1) *Etude de la fixation du radioiode.* – Cette étude a porté sur les explants thyroïdiens provenant d'embryons de Poulet de 14 et de 15 jours d'incubation.

Une étude préliminaire nous avait montré que dans les conditions de la culture organotypique, la thyroïde d'embryon de Poulet aux stades de 6 jours et demi et de 7 jours d'incubation fixe déjà le radioiode, mais celui-ci n'est alors pas lié aux protéines. Au stade de 8 jours d'incubation, on peut déjà déceler des iodothyrosines. A partir du 9^{e} jour d'incubation, nous avons pu mettre en évidence des traces de thyronines. Une étude des thyroïdes prélevées aux stades de 12 à 18 jours d'incubation montre qu'avant le stade de 14 jours, les quantités de thyronines sont faibles et qu'à partir de ce stade, leur production devient notable et s'accroît *régulièrement* avec l'âge de l'embryon (Petrovic et Hay, 1961).

Les explants thyroïdiens ont été cultivés, seuls ou en association, sur le milieu anhormonal renfermant une dose traceuse de ^{131}I (1 μc/ml de milieu nutritif). La radioactivité de chaque explant thyroïdien est mesurée 16 heures après le début de la culture au compteur de Geiger pendant 5 minutes. Nous avons choisi ce délai parce qu'il correspond déjà à la « phase de décharge », particulièrement intéressante du point de vue physiologique.

1°) Thyroïde explantée au stade de 14 jours d'incubation. – Faisant suite à l'étude morphologique, cette analyse vise à préciser les points suivants :

- l'hypophyse a-t-elle une action sur la thyroïde embryonnaire de Poulet *in vitro* ?
- cette action est-elle en rapport avec la constitution cytologique de l'explant préhypophysaire ?
- cette action est-elle modifiée par la culture préalable de la préhypophyse ?
- cette action est-elle spécifique de l'explant préhypophysaire ?

La réponse à ces questions était contenue dans un ensemble de

données numériques dont l'interprétation n'était pas aisée. Comme nous l'avons mentionné au paragraphe sur la conduite des expériences (page 66), nous ne pouvions connaître avec précision ni la masse de l'explant, ni la composition exacte du milieu de culture. Ces fluctuations obligatoires touchaient aussi bien les explants thyroïdiens cultivés seuls, à titre de témoin, que ceux cultivés en association avec un autre organe dont nous cherchions à éprouver l'action.

L'analyse statistique des résultats expérimentaux a comporté plusieurs étapes.

(1) Vérification de l'homogénéité des témoins. Validation de la méthode choisie.

Dans un premier temps, nous avons procédé à une analyse des résultats obtenus avec les explants thyroïdiens cultivés seuls, à titre de témoin.

36 demi-thyroïdes provenant de 6 séries expérimentales constituent notre groupe de référence.

Les 36 autres demi-thyroïdes ont été cultivées en association avec la préhypophyse ou le myocarde. Mais il a fallu leur adjoindre d'autres demi-thyroïdes afin d'obtenir des effectifs sensiblement équivalents dans les différentes catégories expérimentales.

Il s'agissait d'abord de savoir si les six séries de la modalité expérimentale servant de contrôle pouvaient être mélangées, c'est-à-dire être considérées comme étant des échantillons tirés au hasard à partir d'une même population théorique. Nous avons utilisé comme critère d'homogénéité le test F de signification.

Ce test a montré que la variance entre les différentes séries n'est pas supérieure à la variance à l'intérieur d'une série. En effet, le rapport de ces variances est :

$$F = 0{,}369 \quad (F\ 0{,}05 = 4{,}500)$$

Cette constatation nous autorise à tirer les conclusions suivantes :

- la masse de l'explant, la composition du milieu et le mode opératoire n'ont pas varié significativement d'une série à l'autre.
- aucun facteur systématique ne s'étant manifesté dans les séries des témoins, toute différence qui apparaîtra dans les séries comportant les associations ne pourra plus être imputée à la seule technique mise en œuvre, mais devra être considérée comme le résultat du traitement.

(2) Vérification de l'homogénéité des autres catégories expérimentales

Le même test d'homogénéité a été appliqué aux autres modalités expérimentales.

Le rapport des variances F a donné les résultats suivants :

- association thyroïde et préhypophyse « basophile » fraîchement prélevée (th + HB fp)

$$F = 1,25 \quad (F_{0'05} = 2,69)$$

- association thyroïde et préhypophyse « mixte » fraîchement prélevée (th + HM fp)

$$F = 3,126 \quad (F_{0'05} = 4,54)$$

- association thyroïde et préhypophyse « acidophile » fraîchement prélevée (th + HA fp)

$$F = 0,104 \quad (F_{0'05} = 234)$$

- association thyroïde et préhypophyse « basophile » préalablement cultivée (th + HB pc)

$$F = 3,26 \quad (F_{0'05} = 2,26)$$

Ces résultats montrent que les trois premières catégories sont homogènes, mais que la quatrième ne l'est pas.

Cette constatation nous oblige à examiner la quatrième catégorie de plus près. Nous avons réuni dans cette catégorie toutes les séries caractérisées par une durée de culture préalable de l'explant préhypophysaire de 6 à 36 jours.

On serait tenté d'expliquer l'absence d'homogénéité entre les diverses séries précisément par les variations de la durée de culture préalable de l'explant préhypophysaire. Pour tester l'hypothèse d'une corrélation entre la durée de culture préalable de l'explant préhypophysaire et l'intensité des effets observés au niveau de la thyroïde, nous avons exprimé les valeurs de la fixation du radioiode en fonction de la durée de culture préalable (graphique N° 1).

Le graphique N° 1 montre que la durée de culture préalable de la préhypophyse, lorsqu'elle varie entre 6 et 36 jours, n'exerce aucun effet systématique sur la fixation du radioiode par l'explant thyroïdien. Le calcul du coefficient de corrélation confirme cette constatation :

$$r = 0,15 \quad (r_{0'05} = 0,70 \text{ DL} = 6)$$

La durée de culture préalable de l'explant préhypophysaire de 6 à 36 jours et l'intensité de la radioactivité de l'explant thyroïdien sont par conséquent représentées par deux séries de variables indépendantes l'une de l'autre.

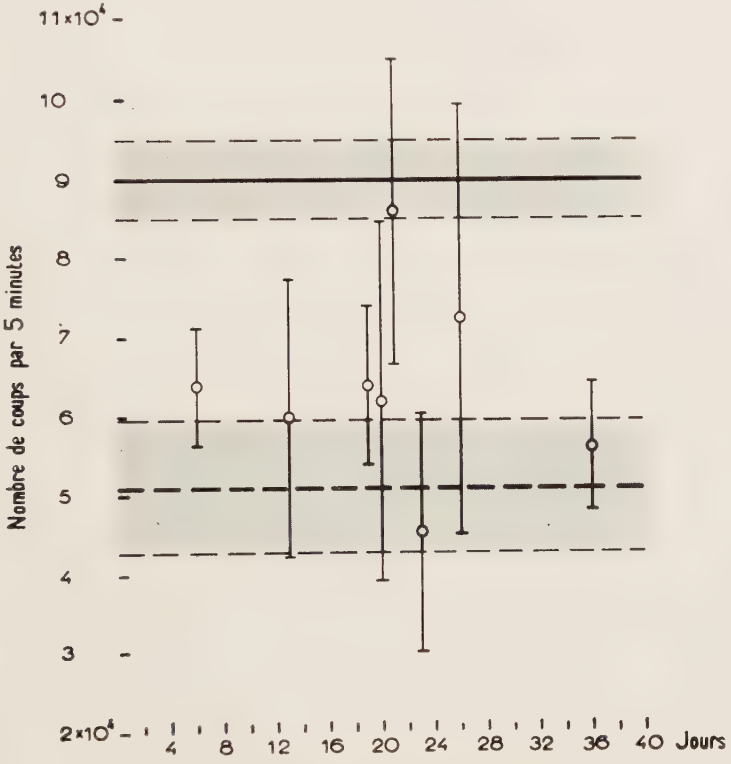
(3) Etude des distributions. Droites de Henry.

Dans cette troisième étape, nous avons étudié les caractères des diverses populations en réunissant l'ensemble des valeurs d'une modalité expérimentale donnée.

Nous avons groupé les mesures de chaque population en différentes classes, dont les effectifs ont été exprimés en pourcentages. Les fréquences ainsi calculées ont été cumulées par ordre croissant des classes.

Au lieu de construire directement la courbe des fréquences cumu-

lées, nous avons préféré tracer les droites de Henry. L'échelle de l'ordonnée est exprimée en unités (« probits ») directement proportionnelles aux probabilités théoriques de la courbe de Gauss. De ce fait, une distribution normale est représentée par une droite et non pas par



GRAPHIQUE N° 1

Radioactivité de l'explant thyroïdien en fonction de la durée de culture préalable de l'explant préhypophysaire.

Moyennes (cercles) et limites des intervalles de confiance de la moyenne (traits verticaux pour le coefficient de confiance de 95 pour 100).

A titre de comparaison (en foncé) :

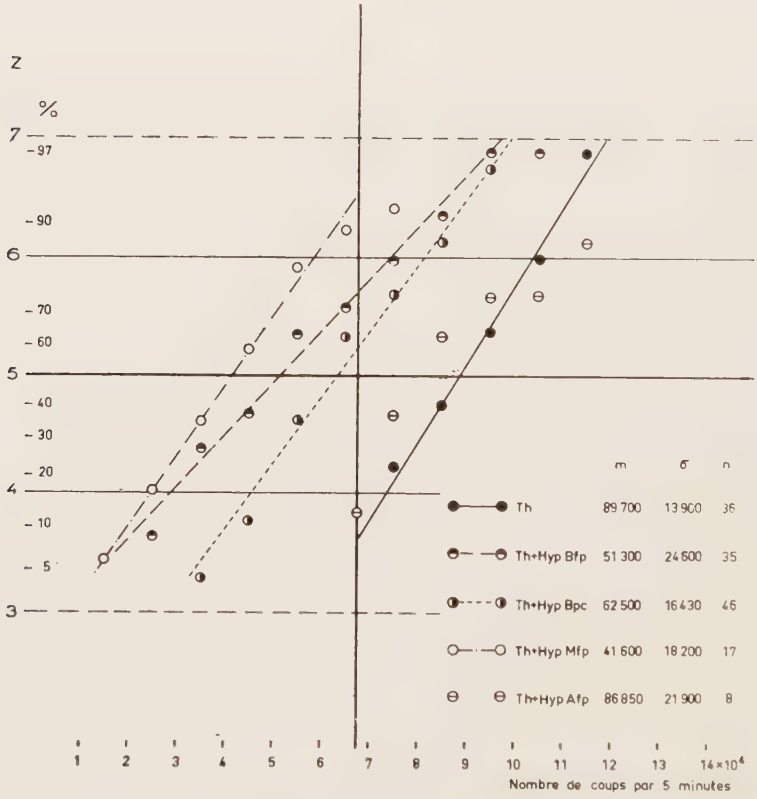
En haut : moyenne et intervalle de confiance de la moyenne de la modalité « th seule ».

En bas : moyenne et intervalle de confiance de la moyenne de la modalité « th et Hyp B fp ».

une courbe en forme de S comme c'est le cas pour des courbes de fréquences cumulées simples.

La droite de Henry se construit en portant en abscisse les limites *supérieures* des différentes classes, et en ordonnée, la fréquence cumulée correspondante. A travers les points ainsi obtenus, on ajuste une droite (graphique N° 2).

Nous avons aussi cherché à tester la normalité des distributions



GRAPHIQUE N° 2
Droites de Henry

On constate en première approximation qu'on peut ajuster quatre droites différentes qui correspondent, chacune, à des points expérimentaux obtenus par les cultures de :

— « th »
— « th + HB fp »
— « th + HB pc »
— « th + HM fp »

Pour une seule distribution (« th + HA fp »), nous n'avons pas tracé de droite à travers les points expérimentaux, l'effectif ayant été trop faible (n = 8).

expérimentales en ajustant une distribution gaussienne idéale aux points expérimentaux. Comme les intersections des droites avec les limites supérieures des classes définissent les fréquences théoriques (voir le graphique N° 2), nous avons comparé ces dernières aux fréquences observées qui leur correspondent. Pour ce faire, on transforme les fréquences relatives des classes en effectifs réels des classes. Les différences entre l'effectif théorique et l'effectif observé de chaque classe sont élevées au carré et divisées par l'effectif théorique de la classe considérée. La somme des valeurs, ainsi calculées, correspond au χ^2.

Les χ^2 ainsi calculées montrent qu'aucune des distributions expérimentales ne diffère significativement de la distribution gaussienne théorique à laquelle elle a été comparée. Malgré l'hétérogénéité des diverses séries, la distribution de l'ensemble des valeurs de la modalité « th+Hyp B pc » ne diffère pas significativement d'une population unique normale. Par conséquent nous pouvons considérer cette dernière comme étant constituée de séries qui ne sont pas tirées au hasard. Cette conclusion nous permet de négliger les différences qui existent entre les diverses séries. Quant à l'effectif de la distribution « th et Hyp A fp » il est trop réduit ($n = 8$) pour que le test de χ^2 ait une signification.

(4) Comparaison des différentes modalités expérimentales entre elles.

Pour répondre aux questions posées au début de ce chapitre, nous allons comparer les différentes modalités expérimentales entre elles.

Nous avons vu que les distributions correspondant aux diverses modalités expérimentales pouvaient être considérées comme normales. Le calcul des paramètres qui caractérisent ces différentes catégories expérimentales doit permettre alors de les comparer entre elles.

La variance intragroupe, c'est-à-dire les fluctuations à l'intérieur de chacune des différentes catégories expérimentales étant sensiblement du même ordre de grandeur, nous avons appliqué la méthode de l'analyse de variance pour comparer les moyennes des différentes modalités expérimentales entre elles.

Le tableau N° VIII résume les résultats de ces comparaisons (comparer aussi avec les données du graphique N° 2) .

La préhypophyse de Cobaye adulte exerce en culture organotypique une action sur la thyroïde d'embryon de Poulet prélevée au stade de 14 jours d'incubation. Cette action s'est manifestée par une forte décroissance de la radioactivité totale de l'explant thyroïdien cultivé sur un milieu renfermant du radioiode.

L'intensité de cette action a varié avec l'origine topique de l'explant préhypophysaire : seuls les explants « basophiles » et « mixtes » se sont révélés aptes à modifier la radioactivité de l'explant thyroïdien; les explants « mixtes » ont même exercé des effets légèrement plus marqués. Les explants « acidophiles » n'ont pas suscité de modifications significatives.

La culture préalable de l'explant préhypophysaire n'abolit pas l'ac-

TABLEAU VIII

Séries comparées	F	$F_{0,05}$	$F_{0,01}$
th seule Hyp B fp	83,8	3,98	7,01
th seule Hyp M fp	132,0	4,03	7,17
th et Hyp B fp th et Hyp M fp	11,0	4,03	7,17
th seule th et Hyp A fp	2,17	4,07	7,27
th seule th et Hyp B pc	113,6	3,96	6,96

tion d'un explant préhypophysaire « basophile ». Lorsque la durée de culture préalable varie entre 6 et 36 jours, les effets observés ne diffèrent pas significativement entre eux.

Reste à savoir si les effets observés sur la thyroïde sont spécifiques d'une activité hormonale de la préhypophyse. Les résultats du tableau N° VIII plaident en faveur d'une action spécifique : un explant « acidophile » ne détermine pas d'effets significatifs. Or, un tel fragment se caractérise, rappelons-le, par l'absence de cellules à activité thyréotrope.

L'association de la thyroïde avec le myocarde embryonnaire vient renforcer l'hypothèse d'une action spécifique de la préhypophyse; cette modalité expérimentale ne nous a pas permis de déceler une éventuelle action trophique du myocarde (le test t de Student entre les deux modalités expérimentales « thyroïde seule » et « thyroïde et myocarde embryonnaire » est égal à : $t = 0,39$; $t_{0,05} = 2,02$).

2°) Thyroïde explantée au stade de 15 jours d'incubation. – Nous avons repris la même étude expérimentale avec des explants thyroïdiens d'embryon de Poulet prélevés au stade de 15 jours d'incubation Pour mieux distinguer l'action spécifique de l'explant préhypophysaire d'une action trophique non-spécifique, nous avons adjoint au fragment de myocarde embryonnaire soit à la thyroïde cultivée seule, soit à l'association *in vitro* de la thyroïde avec la préhypophyse.

Les résultats de cette recherche ont été soumis à une analyse statistique, adaptée aux effectifs plus faibles de ces modalités expérimentales. Le graphique N° 3 et le tableau N° IX résument les résultats obtenus.

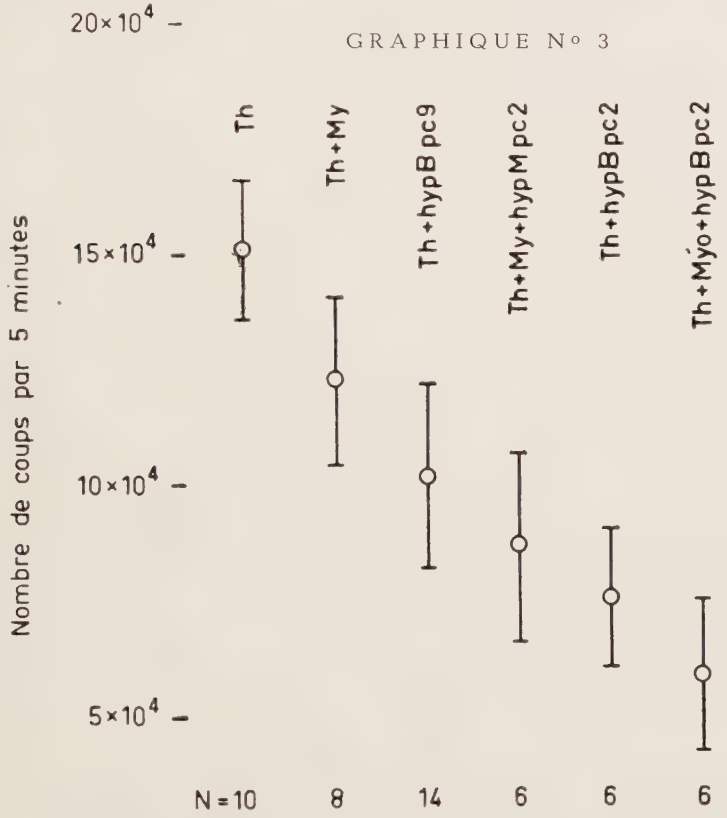
L'examen du graphique N° 3 et du tableau N° IX montre que les explants thyroïdiens prélevés au stade de 15 jours présentent les

mêmes tendances générales que les explants thyroïdiens prélevés au stade de 14 jours.

L'action de la préhypophyse de Cobaye adulte sur la thyroïde d'embryon de Poulet prélevée au stade de 15 jours d'incubation, s'est manifestée par une forte diminution de la radioactivité totale de cette dernière.

L'intensité de cette action a varié avec l'origine topique de l'explant

GRAPHIQUE N° 3



Moyennes (cercles) et intervalles de confiance de la moyenne (traits verticaux) des différentes modalités expérimentales.

Les limites de l'intervalle de confiance de la moyenne sont calculées pour le niveau de confiance de 95 pour 100

préhypophysaire. Mais dans ce cas, ce sont les explants « basophiles » préalablement cultivés pendant 2 jours, qui ont exercé des effets très légèrement plus marqués que les explants « mixtes » également cultivés depuis 2 jours.

Si la durée de culture préalable de l'explant préhypophysaire atteint 9 jours, les effets observés sont bien moins intenses.

Le fragment de myocarde exerce sur l'explant thyroïdien une action

TABLEAU IX

Séries comparées	F	$F_{0{,}05}$	$F_{0{,}01}$
th seule th et Hyp B pc 9	14,48	4,30	7,94
th seule th et Hyp B pc 2	57,00	4,60	8,86
th et Hyp B pc 2 th et Hyp B pc 9	3,09	4,41	8,28
th seule th et myocarde	7,44	4,49	8,53
th et myocarde th, myocarde et Hyp B pc 2	34,14	4,75	9,33
th et myocarde th, myocarde et Hyp M pc 2	9,29	4,75	9,33
th et Hyp B pc 2 th, myocarde et Hyp B pc 2	3,46	4,96	10,04
th, myocarde et Hyp M pc 2 th, myocarde et Hyp B pc 2	7,06	4,96	10,04
th seule th, myocarde et Hyp B pc 2	82,0	4,60	8,86

qui se traduit, elle aussi, par une diminution de la radioactivité totale. Cette action est moins marquée que celle de la préhypophyse. Il ressort encore du graphique N° 3 que l'action du myocarde *s'ajoute* toujours à celle de la préhypophyse. Cette constatation est en faveur d'un mode d'action différent dans les deux cas.

2) *Etude des synthèses iodées.* – La préhypophyse de Cobaye entraîne une diminution de la radioactivité totale de l'explant thyroïdien cultivé sur un milieu renfermant de l'^{131}I.

Comment interpréter cette diminution de la radioactivité totale ? Pour répondre à cette question, nous avons procédé à l'étude des synthèses iodées de l'explant thyroïdien par l'analyse radiochromatographique.

Le tableau N° X résume les résultats relatifs aux synthèses iodées effectuées par l'explant thyroïdien en différentes conditions expérimentales. Les proportions relatives des différents constituants iodés sont exprimés en pourcentages de la radioactivité totale du radiochromatogramme. Nous devons spécifier que les résultats de la radiochromatographie représentent les valeurs obtenues à partir de l'hydrolysat d'une population comportant, selon la catégorie expérimentale, 17 à 46

explants thyroïdiens. Une comparaison rigoureuse entre les différentes catégories expérimentales est impossible : en effet, nous ne connaissons pas la fluctuation intragroupe.

L'étude des résultats obtenus par l'analyse chromatographique nous a permis de faire les constatations suivantes :

(1) L'hydrolyse de la thyroglobuline extraite d'un explant thyroïdien prélevé chez l'embryon de Poulet au stade de 14 jours d'incubation et cultivé pendant 16 heures *in vitro,* libère les substances iodées que l'on trouve dans une thyroïde adulte de Mammifère : les iodures, la monoiodotyrosine (MIT), la diiodotyrosine (DIT) et les thyronines. Les limites de précision de la méthode utilisée ne permettent guère une parfaite séparation des thyronines; nous avons, cependant, constaté que les triiodothyronines n'étaient décelables avec certitude que dans les expériences d'association avec la préhypophyse.

(2) Les quantités de monoiodotyrosine sont toujours supérieures à celles de diiodotyrosine (tableau N° X) : le rapport $\frac{MIT}{DIT}$ s'est révélé dans toutes les modalités expérimentales supérieur à l'unité. Or, l'on sait qu'*in vivo,* les pourcentages de diiodotyrosine sont toujours supérieurs à ceux de monoiodotyrosine (Roche et coll., 1953; Tixier-Vidal et Assenmacher, 1958; Tixier-Vidal, 1958).

L'« inversion » du rapport $\frac{MIT}{DIT}$ traduit certainement un notable ralentissement des biosynthèses iodées en culture organotypique. Pavlovic et ses collaborateurs (1956a) ont d'ailleurs constaté que dans les conditions de la culture, la thyroïde de Rat renferme également relativement plus de monoiodotyrosine que de diiodotyrosine.

3) L'association d'un explant d'embryon de Poulet au stade de 14 jours d'incubation avec la thyroïde de Cobaye adulte entraîne des modifications révélées par la radiochromatographie. On constate que l'intensité de ces modifications varie, d'une part, en fonction de la nature cytologique de l'explant hypophysaire associé, d'autre part, en fonction de la durée de culture de l'explant préhypophysaire avant son association *in vitro* avec la thyroïde.

Les modifications observées consistent dans tous les cas en une nette augmentation de la proportion de thyroxine, une apparition de traces de triiodothyronines et une baisse du rapport $\frac{MIT}{DIT}$. Or, en se référant aux travaux de Roche et ses collaborateurs (1953) et de Tixier-Vidal et Assenmacher (1958), on doit interpréter les modifications observées comme étant l'expression d'une activation plus ou moins importante des synthèses iodées thyroïdiennes en présence d'un explant préhypophysaire.

Il apparaît ainsi que la diminution de la radioactivité totale d'un ex-

TABLEAU X

Modalité expérimentale	Radioactivité totale de l'explant thyroïdien (la moyenne du nombre de coups par 5 minutes)	Résultats de la radiochromatographie de l'hydrolysat thyroïdien				
		thyroxine en pourcent	triiodo-thyronines en pourcent	MIT en pourcent	DIT en pourcent	MIT / DIT
th seule	m = 89 700	0,7	0	59,2	6,7	8,8
th + HB fp	m = 51 300	7,1	traces	36,5	12,5	2,9
th + HM fp	m = 41 600	6,1	traces	45,1	11,3	3,9
th + HB pc 21	m = 85 800	2,7	0	48,8	10,1	4,8
th + HB pc 36	m = 53 100	4,2	0	32,6	7,5	4,3

plant thyroïdien associé *in vitro* à la préhypophyse va de pair avec une activation des synthèses iodées.

On peut en inférer que la diminution de la radioactivité totale résulte de la prédominance de l'excrétion du radioiode thyroïdien hormonal sur la fixation du radioiode minéral à partir du milieu de culture.

Une telle interprétation est en accord avec les travaux de Pavlovic et ses collaborateurs (1956a, 1956b) sur la thyroïde de Rat en culture organotypique : les produits hormonaux élaborés sont aussitôt excrétés dans le milieu de culture.

4) *Discussion et conclusions.* – Nos recherches morphologiques sur la thyroïde d'embryon de Poulet en culture organotypique montrent que cette glande réagit à la stimulation préhypophysaire en fonction de son degré de maturité. La préhypophyse n'agit pas sur la différenciation ontogénétique de la thyroïde embryonnaire, mais simplement sur des processus fonctionnels tels qu'ils s'expriment plus spécialement par des caractères ultrastructuraux.

La thyroïde de l'embryon de Poulet aux stades de 6 jours et demi et de 7 jours d'incubation, associée *in vitro* à un explant préhypophysaire de Cobaye adulte, réagit d'abord par la formation de « lacunes intercellulaires chromophobes » et ensuite par l'accumulation de colloïde extracellulaire. La microscopie électronique montre que le mode de formation de ces lacunes préfigure celui des cavités folliculaires : écartement des membranes cellulaires, apparition d'un produit de sécrétion intracavitaire de densité infiniment plus faible que la colloïde. Dans les thyroïdes prélevées aux stades de 8, 9 et 14 jours d'incubation et cultivées seules, la colloïde apparaît, aux stades de 8 et de 9 jours, sous forme d'une substance floconneuse dans des cavités créées par l'écartement des membranes cellulaires. Ce phénomène est précédé par l'apparition dans les cellules thyroïdiennes de sacs ergastoplasmiques dont le contenu est semblable à celui des cavités folliculaires. Aucun matériel figuré n'est décelable dans les structures golgiennes réparties de façon diffuse dans le cytoplasme. Des vésicules denses se rencontrent fréquemment dans les zones golgiennes; mais elles se forment par pinocytose dans le cytoplasme apical et ne résultent pas d'une élaboration golgienne. L'association avec un explant préhypophysaire entraîne dans l'explant thyroïdien à tous les stades un développement plus ou moins intense de structures ergastoplasmiques. La dilatation des sacs par l'accumulation d'une substance élaborée traduit une intensification de la fonction sécrétoire. Ce phénomène s'accompagne d'une apparition plus précoce et d'une accumulation plus importante de colloïde extracellulaire. Les processus de résorption sont également intensifiées; mais cette action de la préhypophyse ne devient marquée que dans les explants thyroïdiens prélevés au 14^{e} jour d'incubation où elle entraîne la formation d'un grand nombre de vésicules et de vacuoles à contenu plus ou moins dense, qui envahissent progressivement la cellule à partir du pôle apical. Les gouttelettes colloïdes intracytoplasmiques sont une image de résorption intense de la colloïde intrafolliculaire.

Les investigations sur la fixation du radioiode et l'analyse radiochromatographique des synthèses iodées de la thyroïde d'embryon de Poulet prélevée au stade de 14 jours d'incubation, sont en parfait accord avec les données morphologiques. Elles montrent que la thyroïde, en culture organotypique, réagit à la stimulation préhypophysaire de la même façon qu'*in vivo*. La stimulation thyréotrope de l'explant thyroïdien a pour effet une augmentation significative de la proportion de thyroxine et une diminution du rapport MIT dans l'hydrolysat thyroïdien, allant de pair avec une baisse importante de la radioactivité totale de l'explant thyroïdien telle qu'elle est déterminée 16 heures après le début de la culture.

Les données morphologiques et physiologiques concordent encore sur un point : un fragment excisé dans la région postérolatérale de la préhypophyse de Cobaye, où l'unique cellule chromophile est représentée par des cellules acidophiles, reste sans effet sur la thyroïde. Nos observations en culture organotypique confirment par conséquent celles de Rebel et Marescaux (1958) obtenues dans les conditions de l'homogreffe intrathyroïdienne.

L'activité thyréostimulante de la préhypophyse apparaît notablement diminuée après quelques jours de culture. Elle ne montre cependant aucune tendance systématique à augmenter ou à diminuer lorsque la durée de culture d'un explant préhypophysaire avant son association avec la thyroïde varie entre 6 et 36 jours.

d) CONCLUSIONS

Cultivée sur le milieu semi-synthétique, la préhypophyse de Cobaye adulte conserve *in vitro* une activité thyréostimulante, gonadostimulante et corticostimulante démontrée par les expériences d'association avec l'organe effecteur.

La conservation de caractères cytologiques propres aux cinq variétés des cellules chromophiles explique la persistance de l'activité fonctionnelle d'un explant préhypophysaire cultivé sur le milieu semi-synthétique.

L'adjonction d'un extrait de cerveau fœtal au milieu semi-synthétique provoque d'importantes modifications ultrastructurales de l'explant préhypophysaire allant de pair avec une nette diminution de l'activité hormonale.

L'intensité des activités gonadotrope, thyréotrope et corticotrope d'un explant préhypophysaire décroît après quelques jours de culture. Il existe une corrélation entre la disparition des granulations chromophiles préexistantes et les effets de stimulation particulièrement intenses sur les organes effecteurs tels que nous les avons observés dans les premiers jours de culture.

Tout se passe comme si la préhypophyse, séparée de ses connexions anatomiques et physiologiques normales et mise en culture, libérait

rapidement ses réserves et qu'ensuite ne persistait qu'une faible activité sécréto-excrétrice. Lorsque les méthodes d'observation sont suffisamment sensibles, une activité hormonale de la préhypophyse est décelable après plusieurs semaines de culture. Soulignons, encore, que Pasteels (1961) a démontré que l'activité lactogénique, contrairement aux autres activités préhypophysaires, augmente dans les conditions de la culture.

3 - Caractères cytologiques des explants préhypophysaires greffés après culture préalable

Nous avons montré qu'un explant préhypophysaire de Cobaye perd en culture organotypique la quasi-totalité de ses granulations cytoplasmiques chromophiles. Pour répondre à la question de savoir si la disparition en culture organotypique des granulations secrétoires est un phénomène réversible, nous avons pratiqué l'homoimplantation intratesticulaire, intrathyroïdienne et intraovarienne de fragments de préhypophyse préalablement cultivés pendant 3 à 7 semaines.

Le but recherché était double : il s'agissait, d'une part, de suivre l'évolution cytologique de la préhypophyse greffée après culture préalable et, d'autre part, de comparer ses effets locaux avec ceux qu'exerce une préhypophyse greffée sitôt après prélèvement.

Ces expériences ne visent donc nullement à aborder le problème des relations hypothalamo-préhypophysaires *in vivo* : c'est une question que, en ce qui concerne le Cobaye, nous avons envisagé ailleurs (M. Aron et Petrovic, 1959, 1960). Le problème du contrôle hypothalamique des sécrétions hormonales a bénéficié ces dernières années de très nombreuses recherches que nous ne saurions même résumer dans le cadre de ce travail. Aussi nous contenterons-nous de renvoyer à quelques articles fondamentaux (Fortier, 1951; Benoit et Assenmacher, 1955; Euler et Holmgren, 1956 a, 1956 b; Harris, 1956; Courrier et Colonge, 1957; Vivien et Schott, 1958; Ganong et Forsham, 1960; Alloiteau, 1961; Assenmacher, 1961; Benoit, 1961; Da Lage, 1961; Guillemin, 1961; Kordon, 1961; Libert, 1961; Mayer, 1961; Moszkowska, 1961; Racadot, 1961; Soulairac, 1961).

a) IMPLANTATION INTRATESTICULAIRE

1) *Expériences chez le Cobaye*

1°) *Homotransplantation d'explants préhypophysaires préalablement cultivés*

Chez l'animal normal. – Un explant préhypophysaire cultivé pendant 3 à 7 semaines sur le milieu semi-synthétique est inoculé dans un testicule. L'étude d'une soixantaine de testicules porte-greffons prélevés après des laps de temps s'échelonnant entre 40 heures et 6 mois montre que la préhypophyse greffée après culture préalable survit dans tous

les cas et devient un authentique homogreffon. Durant cet intervalle, les explants préhypophysaires subissent une évolution histologique toujours identique.

Quarante heures après l'implantation, la structure de l'explant devenu transplant est encore comparable à celle des explants cultivés pendant 3 à 7 semaines. Dans les jours suivants, les cellules de l'implant deviennent plus volumineuses et leur noyau plus clair. Cependant, le cytoplasme est toujours aussi pauvre en granulations spécifiques (Fig. 16). Entre le 6e et le 10e jour après l'inoculation intratesticulaire, le cytoplasme cellulaire redevient fortement pyroninophile (réaction de Brachet) et commence à se charger en granulations spécifiques. Ce processus cytologique va en s'accentuant et au cours de la 3e semaine après l'implantation, les cellules de l'explant préhypophysaire ont récupéré une chromophilie quasi-normale. Il convient de préciser que nous avons pu établir une relation chronologique entre la *revascularisation* de l'explant devenu homogreffon et la *réapparition massive de granulations chromophiles* (Fig. 17 et 18). L'application des techniques histologiques et cytochimiques préconisées par Herlant (1956, 1958, 1961) nous a permis non seulement de retrouver dans les homogreffons de préhypophyse préalablement cultivés les 5 types cellulaires chromophiles, mais encore de constater que, tous, ils sont remplis de granulations (α, β, γ, δ et ε).

Les explants préhypophysaires devenus homotransplants intratesticulaires exercent sur les éléments du testicule les mêmes effets qu'un fragment de *pars distalis* greffé sans culture préalable : les cellules interstitielles situées au voisnage de l'implant subissent une forte hypertrophie accompagnée d'hyperplasie; la lignée séminale est involuée, sauf dans les premiers jours après la greffe où l'on peut observer des images de stimulation (Fig. 15 et 16). Des expériences antérieures (Petrovic et coll., 1953 a, 1953 b; M. Aron et coll., 1953; Petrovic, 1954) ont démontré que l'involution de la lignée séminale chez le Cobaye résulte d'une action spécifique de la préhypophyse : en effet, l'homogreffe intratesticulaire d'un fragment de thyroïde ou d'un autre organe ne suscite pas de modifications involutives dans les tubes séminifères.

Le degré de stimulation de la glande interstitielle est par conséquent *de l'ordre* de celui que l'on observe après des délais identiques dans les expériences d'homogreffe intratesticulaire de *pars distalis* fraîchement prélevée, ce qui indique que l'activité gonadotrope des greffons préalablement cultivés *in vitro* est sensiblement identique à celle des greffons provenant d'hypophyse fraîche. L'action des deux sortes de greffons sur la lignée spermatogénétique est également semblable.

Si l'explant préhypophysaire est cultivé avant la greffe intratesticulaire sur le mélange « milieu semi-synthétique-extrait de cerveau fœtal », la « récupération » morphologique n'est plus aussi parfaite (Fig. 19). On distingue néanmoins de nombreuses cellules à cytoplasme fortement pyroninophile et rempli de granulations chromophiles. Les éléments du testicule présentent les modifications habituelles.

Chez l'animal hypophysectomisé. – Cette modalité comporte deux éventualités.

Dans un premier cas, l'explant préhypophysaire de Cobaye adulte, préalablement cultivé pendant 3 à 4 semaines sur le milieu semi-synthétique, est inoculé dans le testicule d'un Cobaye hypophysectomisé depuis 4 jours. L'animal porte-greffon est sacrifié 2 à 12 jours après l'inoculation. On constate alors que les cellules du greffon préhypophysaire ont, *toutes,* un cytoplasme pratiquement chromophobe (dépourvu de granulations chromophiles), mais nettement pyroninophile (réaction de Brachet) (Fig. 21). La glande interstitielle est légèrement hypertrophiée et les tubes séminifères montrent des images de dégénérescence de l'épithélium séminal telles qu'on les voit après l'hypophysectomie totale.

Dans un deuxième cas, on pratique d'abord l'homogreffe intratesticulaire d'un explant préhypophysaire de Cobaye adulte, préalablement cultivé pendant 3 à 4 semaines sur le milieu semi-synthétique. L'animal porte-greffon n'est hypophysectomisé que 6 semaines après l'inoculation, puis sacrifié 2 à 14 jours plus tard. Dans ce cas, on constate que les cellules du greffon préhypophysaire perdent progressivement leurs granulations chromophiles, tout en conservant leur pyroninophilie. Seules persistent, quelquefois, les granulations du type α et ε. La glande interstitielle apparaît hypertrophiée et hyperplasiée et la lignée séminale involuée (Fig. 20).

Tout se passe donc, dans les deux cas, comme si par suite du déséquilibre endocrinien provoqué par l'hypophysectomie, les cellules de l'explant préhypophysaire devenu homogreffon ne procèdent plus au stockage des produits de leur activité élaboratrice.

2°) *Hétérotransplantation d'explants préhypophysaires préalablement cultivés.* – Nous avons pratiqué également la transplantation hétéroplastique.

L'hétérotransplantation, dans le testicule de Cobaye, d'un explant préhypophysaire de jeune Rat, préalablement cultivé pendant 4 semaines sur le milieu semi-synthétique, montre que le greffon survit pendant 3 à 5 semaines (Fig. 23). Ce délai est suffisant pour voir réapparaître dans l'implant des cellules chromophiles de toutes les variétés. Les cellules interstitielles du testicule sont d'ailleurs nettement hypertrophiées et les tubes séminifères involués. Ces résultats sont sensiblement identiques à ceux observés après l'hétérotransplantation, dans le testicule de Cobaye, d'un fragment de préhypophyse fraîchement prélevée chez un jeune Rat (Fig. 22).

L'hétérotransplantation, dans le testicule de Cobaye, d'un explant préhypophysaire de fœtus humain de 7 mois, préalablement cultivé pendant 4 semaines sur le milieu semi-synthétique, a abouti à des résultats de même nature (Fig. 24). L'examen des testicules porte-greffons montre que 25 jours après l'inoculation, l'implant est constitué de cellules chromophiles et de cellules chromophobes. Les cellules interstitielles sont hypertrophiées et la lignée séminale involuée.

3°) *Homotransplantation d'explants préhypophysaires et corticosurrénaliens préalablement cultivés.* – L'homotransplantation intrasurrénalienne d'explants préhypophysaires préalablement cultivés est une opération délicate chez le Cobaye. Nous n'avons pas réussi à constituer une série expérimentale.

Aussi avons-nous cherché à surmonter la difficulté par le détour d'une implantation combinée de préhypophyse et de cortex surrénalien dans le testicule.

L'homogreffe intratesticulaire d'un explant corticosurrénalien de Cobaye, préalablement cultivé pendant 3 semaines, montre que, 6 semaines après l'inoculation, le greffon est toujours constitué de cellules de la zone sous-capsulaire et de cellules de la zone glomérulaire (Fig. 28). Cette image est sensiblement identique à celle d'un fragment excisé dans la région superficielle du cortex surrénalien et greffé dans le testicule (Fig. 27). La forme générale d'un explant préalablement cultivé est, évidemment, toujours plus arrondie. L'homogreffe intratesticulaire d'un explant corticosurrénalien de fœtus de Cobaye de 6 cm, préalablement cultivé pendant 10 jours, permet de constater que, dans ce cas, le greffon renferme, en plus des cellules glomérulaires, des spongiocytes cytologiquement différenciés mais non-disposés en faisceaux (Fig. 29).

2) *Expériences chez le Rat.*

Ces expériences avaient pour but de compléter les précédentes.

L'homogreffe intratesticulaire d'un explant préhypophysaire de Rat adulte, préalablement cultivé pendant 4 semaines sur le milieu semi-synthétique, montre que l'implant est formé, 2 à 5 semaines après l'inoculation, de cellules à cytoplasme chromophile (Fig. 25). Il est possible de distinguer les 5 variétés des cellules chromophiles. La glande interstitielle du testicule est hypertrophiée et hyperplasiée. Quant aux tubes séminifères, ils apparaissent tout à fait normaux. Dans ce cas encore, la comparaison de nos résultats avec les expériences d'homogreffe de fragments préhypophysaires non-cultivés (Petrovic, 1955) montre une quasi-identité de la réaction testiculaire.

Les expériences d'hétérotransplantation, dans le testicule du Rat, d'un explant préhypophysaire de jeune Cobaye préalablement cultivé pendant 4 semaines sur le milieu semi-synthétique, montrent que l'implant est formé, 2 à 3 semaines après l'inoculation de cellules chromophiles et chromophobes (Fig. 26). Les cellules interstitielles sont légèrement hypertrophiées et les tubes séminifères sont comme dans le testicule controlatéral, en préspermatogenèse.

3) *Expériences chez le Hamster.*

La surrénalectomie bilatérale totale est une opération très difficile à réussir chez le Cobaye. Aussi avons-nous repris les expériences de greffe combinée de préhypophyse et corticosurrénale dans le testicule

d'un Hibernant, le Hamster ordinaire *(Cricetus cricetus)*, qui se prête facilement à une surrénalectomie bilatérale. *

Les expériences antérieures (Petrovic et Kayser, 1956, 1957, 1958) avaient montré que le testicule de Hamster est un milieu favorable à la réussite des homogreffes de glandes endocrines. Elles nous avaient même permis de déceler l'existence d'une action du greffon préhypophysaire à distance (Petrovic et Kayser, 1958) : en automne, lorsque le seuil réactionnel de la thyroïde à la thyréostimuline est très abaissé, nous avons pu observer l'image histologique d'une forte activité sécréto-excrétrice de la thyroïde chez un animal porteur d'un greffon préhypophysaire intratesticulaire. Si l'on pratique l'homogreffe intratesticulaire d'un explant cortico-surrénalien de Hamster ordinaire nouveauné, préalablement cultivé pendant 2 semaines, et que l'on surrénalectomise l'animal porte-greffon au bout de quelques semaines, l'examen du testicule porte-greffon, prélevé 6 mois plus tard, montre que l'implant est formé d'une couronne de cellules de la zone souscapsulaire et, au centre, de cellules qui offrent les caractères de spongiocytes (Fig. 32 à droite). Ceux-ci présentent parfois l'image d'involution fonctionnelle (Fig. 30).

Nous avons procédé dans les expériences d'association de la façon suivante.

Un explant préhypophysaire préalablement cultivé durant 25 jours, a été associé *in vitro* pendant 5 jours avec un fragment de corticosurrénale fraîchement prélevée. Le complexe « préhypophyse-cortex surrénalien » fut ensuite greffé dans le testicule de Hamsters adultes, cependant qu'un fragment de cortex cultivé préalablement seul pendant 5 jours, fut implanté, à titre de témoin, dans le testicule controlatéral. Quelques semaines plus tard, les animaux furent surrénalectomisés, puis sacrifiés après des délais allant de 3 à 6 mois. Il résulte de l'examen comparatif des deux testicules porte-greffons (Fig. 31 et 32) que dans tous les cas, la *pars distalis* avait récupéré une activité hormonogène suffisante pour entraîner au niveau des cellules corticosurrénaliennes situées à son contact une forte hypertrophie, accompagnée d'une fine vacuolisation de tout le cytoplasme. Aucune variété de cellules chromophiles de l'explant préhypophysaire devenu greffon intratesticulaire ne s'est révélée dépourvue de granulations sécrétoires spécifiques et n'a présenté de modifications trahissant une éventuelle rétroaction locale négative des hormones corticosurrénaliennes. Or, nous allons voir que chez le Cobaye, en des conditions analogues (greffe combinée intratesticulaire d'un explant préhypophysaire préalablement cultivé et d'un fragment de thyroïde), une catégorie de cellules chromophiles (les cellules δ selon la terminologie de Herlant, 1958) n'accumule plus dans le cytoplasme les granulations chromophiles spécifiques, en l'occurrence le matériel fuchsine-paraldéhyde positif.

---

* Le Hamster ordinaire est un Hibernant dont les glandes endocrines présentent un cycle annuel (voir à ce sujet : Kayser, 1961). Aussi tenons-nous à préciser que les animaux furent sacrifiés fin novembre.

b) IMPLANTATION INTRATHYROÏDIENNE

Les explants préhypophysaires, cultivés *in vitro* pendant 3 à 7 semaines et inoculés dans la thyroïde, deviennent de véritables greffons. Ce résultat rejoint les observations de greffe intrathyroïdienne de fragments de *pars distalis* non cultivés (Petrovic et Aron, 1957; Rebel et Marescaux, 1958).

Chez le Cobaye normal. – Entre le 5e et 8e jour après l'inoculation, le cytoplasme de nombreuses cellules de l'implant préhypophysaire redevient intensément pyroninophile et riche en granulations chromophiles. Les effets thyréostimulants, caractérisés par une forte activité sécrétoexcrétrice des vésicules thyroïdiennes, se manifestent aussitôt après l'implantation, à condition toutefois que l'explant devenu homogreffon intrathyroïdien n'ait pas été excisé dans l'étroite zone postéro-latérale de la glande *in situ* (Fig. 32 et 34). Nos observations sur ce dernier point sont en accord avec les travaux de Rebel et Marescaux (1958).

Chez le Cobaye hypophysectomisé. – L'implantation de l'explant préhypophysaire préalablement cultivé depuis 4 semaines, est effectuée immédiatement après l'hypophysectomie. Nous ne disposons que de 3 expériences de cette catégorie expérimentale. Elles semblent confirmer néanmoins la constatation faite à l'occasion de la greffe intratesticulaire chez le Cobaye hypophysectomisé : les cellules de l'explant préhypophysaire devenu homogreffon intrathyroïdien, ne sont plus le siège d'une forte accumulation de granulations chromophiles. Les vésicules thyroïdiennes réagissent pourtant par une élévation de l'épithélium et par une disparition de colloïde. Toutefois, cette réaction est apparue moins intense que chez l'animal normal. Une particularité est à souligner : le cytoplasme des cellules δ bourré, dans les greffons intratesticulaires de matériel fuchsine-paraldéhyde-positif (Fig. 35), en est quasiment dépourvu dans les greffons intrathyroïdiens (Fig. 34). Les cellules réputées responsables de l'élaboration de la thyréostimuline (Purves et Griesbach, 1951; Halmi, 1952; Rebel et Marescaux, 1958; Racadot, 1959; M. Aron et Petrovic, 1959) fonctionnent donc différemment suivant qu'elles se trouvent dans le testicule ou dans la thyroïde. C'est le voisinage du tissu thyroïdien qui semble responsable de ce phénomène. En effet, si un explant préhypophysaire est greffé conjointement avec un fragment de thyroïde fraîchement prélevé chez un Cobaye adulte, le cytoplasme des cellules n'est plus le siège de cette forte accumulation de matériel fuchsine-paraldéhyde-positif *. Tout se passe comme si l'hormone ou les hormones thyroïdiennes exercent une action inhibitrice *directe* sur la cellule préhypophysaire élaborant la thyréosti-

* Ce résultat peut être rapproché d'une observation faite chez le Hamster (Petrovic et Kayser, 1958). En automne, — lorsque de très faibles taux de thyréostimuline deviennent efficaces en raison de l'abaissement saisonnier du seuil réactionnel de la thyroïde dans cette espèce — un homogreffon préhypophysaire intratesticulaire détermine une stimulation des deux lobes thyroïdiens plus forte que celle qu'un fragment préhypophysaire intrathyroïdien suscite dans le lobe controlatéral.

muline. Il convient de souligner tout de suite, à propos de cette observation concernant les cellules δ, que dans les conditions analogues, nous n'avons pu déceler un phénomène d'action inhibitrice directe des hormones sexuelles et corticosurrénaliennes sur les cellules élaborant respectivement l'hormone ou les hormones gonadotropes et l'hormone corticotrope.

c) IMPLANTATION INTRAOVARIENNE.

Les explants préhypophysaires cultivés *in vitro* durant 3 à 5 semaines et inoculés ensuite dans l'ovaire deviennent des greffons authentiques (Petrovic et Lavillaureix, 1959).

Chez le Cobaye normal. – L'explant préhypophysaire devenu homogreffon intraovarien, subit la même évolution que celle que nous avons décrite à propos des greffes dans le testicule et l'ovaire : il se revascularise rapidement; le noyau et le cytoplasme cellulaires reprennent progressivement les caractères de taille perdus en culture; dès la fin de la première semaine (réaction de Brachet), le cytoplasme des nombreuses cellules redevient fortement pyroninophile, puis chromophile par réapparition massive de granulations cytoplasmiques spécifiques. Ce phénomène est particulièrement net dans les expériences de greffe de longue durée (Fig. 41). Les colorations appropriées permettent de mettre en évidence les 5 variétés de cellules chromophiles.

L'examen comparatif de l'ovaire porte-greffon et de l'ovaire controlatéral permet de mettre en évidence une activité hormonale des explants préhypophysaires devenus implants intraovariens. Cette activité peut être tenue pour spécifique : nous n'avons pas observé les mêmes modifications de l'ovaire avec les autres organes implantés à titre de témoin (thyroïde, rate, ganglion lymphatique).

Le porte-greffon montre une image toujours identique : tous les follicules sont frappés d'atrésie dès qu'ils atteignent une certaine taille et se transforment en nodules thécaux (Fig. 37, 39 et 44). On n'observe la formation de corps jaunes, spontanés ou expérimentaux, que dans les tout premiers jours qui suivent l'implantation de la préhypophyse (Fig. 37). On reconnaît, en revanche, une légère hypertrophie des cellules constitutives de nodules thécaux situés au voisinage immédiat du greffon préhypophysaire. Dans les expériences à long terme, cette hypertrophie de cellules d'origine thécale, devient même très importante et s'accompagne d'une fine vacuolisation cytoplasmique (Fig. 42).

L'ovaire controlatéral non-inoculé est le siège des phénomènes de croissance folliculaire (Fig. 36 et 40) aboutissant à la ponte et à la formation de corps jaunes.

Chez le Cobaye hypophysectomisé. – Dans cette modalité expérimentale, nous avons pratiqué l'homogreffe d'un explant préhypophysaire de Cobaye adulte, préalablement cultivé pendant 4 semaines sur le

milieu semi-synthétique, dans l'ovaire d'un Cobaye qui vient d'être hypophysectomisé. L'examen de l'ovaire porte-greffon montre que 12 jours encore après l'hypophysectomie, les cellules du greffon préhypophysaire ne manifestent pratiquement aucune chromophilie.

Par contre, les effets habituels sur l'ovaire ne font pas défaut. En particulier, on observe, dans quelques cas, la formation de corps jaunes dans l'ovaire porte-greffon. Mais, surtout, les cellules constitutives avoisinant l'explant préhypophysaire offrent toujours une ébauche d'hypertrophie allant de pair avec une fine vacuolisation du cytoplasme.

L'ovaire controlatéral, non-inoculé, montre toujours une atrésie généralisée. Quelques follicules secondaires offrent les signes d'une croissance lente : cellules folliculeuses à noyau petit et dense et à cytoplasme peu abondant; les mitoses sont exceptionnelles. Il n'a jamais présenté de corps jaunes.

Les expériences de greffe intraovarienne d'explants préhypophysaires, préalablement cultivés pendant quelques semaines, permettaient d'envisager la nature de leur activité hormonale. Pour essayer de répondre à cette question, nous avons examiné les organes effecteurs.

Dans la presque totalité de nos expériences de greffe chez l'animal hypophysectomisé, le vagin a présenté une couche profonde multistratifiée, accompagnée quelquefois d'une ébauche de kératinisation, et une couche superficielle épaisse et festonnée. Il s'agit là d'une nette tendance à l'évolution œstrale.

L'épithélium de la corne utérine est modérément hypertrophié; il montre les signes d'une faible activité proliférative. Les cellules conjonctives du chorion sous-jacent apparaissent plutôt en état de repos.

d) DISCUSSION ET CONCLUSIONS.

Il ressort de ces résultats que la disparition presque totale des granulations chromophiles au cours de la culture organotypique des explants préhypophysaires de Cobaye, de Rat et de Hamster, est un phénomène réversible : la greffe ultérieure, homoplastique ou hétéroplastique de ces explants est suivie de la réapparition massive de toutes les variétés de granulations chromophiles (α, β, γ, δ, ε). Il y a lieu de souligner que le cytoplasme redevient d'abord fortement pyroninophile (réaction de Brachet), puis chromophile.

Précisons que dans les conditions de nos expériences, nous avons pu déceler des images d'hypertrophie, mais non des phénomènes d'hyperplasie des celules ε.

Nous avons mis en évidence une relation chronologique constante entre la revascularisation de l'explant préhypophysaire devenu homogreffon et la réapparition massive de granulations chromophiles mûres. A ce propos, nous devons rappeler qu'en pratiquant l'homotransplantation intratesticulaire (Petrovic et coll., 1953a, 1954b; M. Aron et coll.,

1953; PETROVIC, 1954) ou intraovarienne (PETROVIC et LAVILLAUREIX, 1958, 1959a) d'un fragment de préhypophyse non-cultivé préalablement, nous avons observé une phase initiale, transitoire, caractérisée par la disparition quasi-totale des granulations chromophiles, suivie, au bout de quelques jours, de la récupération d'une structure cytologique normale. Or, cette phase coïncide avec la période durant laquelle les connexions vasculaires entre l'implant et son nouveau site ne sont pas encore établies.

Nos observations ont permis de mettre en évidence une corrélation, – sans établir de rapport de cause à effet. De fait, la revascularisation assure non seulement de meilleures conditions de nutrition, mais aussi un apport accru de principes plasmatiques. Parmi ceux-ci figurent en bonne place les principes élaborés par les centres hypothalamiques. VIVIEN et SCHOTT (1958), FORTIER et WARD (1958), M. ARON et PETROVIC (1960), parmi d'autres, ont apporté des arguments en faveur du passage de substances d'origine hypothalamique dans la circulation générale La nature des rapports du neurosécrétat hypothalamique avec la préhypophyse (STUTINSKY, 1956) ne s'oppose pas à un tel phénomène. C'est un problème que nos recherches ne résolvent pas. Elles apportent cependant un élément de réponse : les fragments de préhypophyse, greffés après culture préalable, ne présentent pas une accumulation de granulations chromophiles aussi *intense* chez le Cobaye hypophysectomisé que chez le Cobaye normal.

L'on peut admettre que cette différence s'explique par l'équilibre dynamique entre les cellules du greffon préhypophysaire et les hormones antéhypophysaires circulantes. Tout en fonctionnant probablement à un niveau plus élevé, le greffon chez l'animal hypophysectomisé offre un caractère commun avec l'explant en culture organotypique : dans les deux cas, les fines vésicules cytoplasmiques, – lieu d'élaboration des produits sécrétoires spécifiques, – ne subissent pas la densification poussée de leur contenu qui aboutit normalement à la formation de granulations chromophiles; le contenu vésiculaire est éliminé à un stade précoce de densification. La glande secrète et excrète, sans procéder au stockage.

Nous devons encore signaler que MARTINOVIC (1954) ayant transplanté dans la chambre antérieure de l'œil des explants de préhypophyse de Rat préalablement cultivés, n'a pas observé une réapparition massive de granulations chromophiles.

Nous ne discuterons pas en détail *la nature* de l'action hormonale des explants préhypophysaires devenus greffons. C'est un problème qui sort du cadre de ce travail.

En situation intrathyroïdienne, l'implant préhypophysaire exerce des effets thyréostimulants. Greffé en association avec le cortex surrénalien, il exerce les effets qui, qualitativement, ne semblent guère différents de ceux observés en culture organotypique.

Restent les greffons intragonadiques. Nous tenons seulement à souligner le remarquable parallélisme dans l'action sur le testicule et sur

l'ovaire : dans les deux cas, on note une inhibition de l'évolution spermatogénétique et de la croissance folliculaire; dans les deux cas, on observe des effets de stimulation de cellules interstitielles, – représentées dans l'ovaire par les éléments de nodules thécaux. Ces cellules thécales stimulées sont d'ailleurs le seul élément que l'on puisse rendre responsable de la sécrétion hormonale qui est à l'origine de l'évolution œstrale du vagin et de la légère hypertrophie et hyperplasie de l'épithélium de la corne utérine.

Précisons encore, pour terminer, le point suivant : qu'ils proviennent d'un mâle ou d'une femelle, les fragments préhypophysaires de Cobaye, greffés dans le testicule et l'ovaire après culture préalable, exercent des effets qualitativement et quantitativement absolument identiques.

VI - CONCLUSIONS GÉNÉRALES

La culture organotypique, avec conservation par l'explant de l'organisation anatomo-microscopique et de la structure histologique de l'organe d'origine, offre de nouvelles possibilités d'analyse en endocrinologie expérimentale. Il est possible d'étudier les aptitudes fonctionnelles de la préhypophyse en l'associant *in vitro* avec un des organes-effecteurs tels que la thyroïde, la cortico-surrénale, le testicule, – à l'abri de l'influence du reste de l'organisme et, surtout, des glandes endocrines. On peut même réaliser des associations interspécifiques à l'abri des incompatibilités de nature immunologique telles qu'elles se manifestent dans l'hétérotransplantation.

En de telles conditions expérimentales, la recherche se doit d'emprunter la voie de l'analyse. Aussi nous sommes-nous efforcé essentiellement de relater les faits observés.

Dans ce travail d'analyse, l'interprétation a consisté pour nous à mettre en valeur les faits observés et à les disposer selon les rapports qui les unissent. Rechercher la signification des faits eut été déjà un travail de synthèse que ne justifiait pas encore l'état actuel de nos recherches.

*

Nos observations en microscopie électronique montrent que les cellules préhypophysaires de Cobaye conservent en culture organotypique, sur un milieu approprié, leurs caractères ultrastructuraux pendant plusieurs semaines. Le noyau, le nucléole, les mitochondries et les éléments golgiens apparaissent inchangés. Le reticulum cytoplasmique et l'ergastoplasme subissent quelques modifications involutives mais conservent l'aspect et l'organisation générale de la variété cellulaire. L'application de la méthode de Brachet montre que le cytoplasme de la plupart des cellules conserve les structures pyroninophiles. Seules les granulations secrétoires disparaissent presque totalement, ce qui se traduit en microscopie optique par une chromopho-

bie uniforme de toutes les cellules préhypophysaires. Cependant, la présence de quelques rares granulations ainsi que la persistance des caractères ultrastructuraux spécifiques du réticulum cytoplasmique et de l'ergastoplasme permettent de reconnaître dans l'explant préhypophysaire les 5 variétés de celules chromophiles (α, β, γ, δ, ε). A en juger par la richesse en ergastoplasme différencié, les celules ε sont le siège d'une activité fonctionnelle supérieure à celle des autres types cellulaires. Mais, fait important, ces autres variétés cellulaires non seulement ne disparaissent pas, mais encore continuent à offrir les signes d'une légère, mais nette activité sécrétoire.

Nos résultats ne nous ont pas permis d'aborder un problème fondamental de cytophysiologie : les fonctions gonadotrope, corticotrope et thyréotrope, sont-elles en culture organotypique dévolues, chacune, à une catégorie cellulaire particulière et, dans l'affirmative, à laquelle ? D'autre part, les caractères morphologiques et cytochimiques d'une cellule, sont-ils l'expression d'une spécialisation fonctionnelle définitive ou bien l'expression d'un état fonctionnel momentané ?

*

Pour répondre à la question de savoir si la disparition en culture organotypique des granulations secrétoires est un phénomène réversible, nous avons pratiqué l'implantation dans le testicule, dans l'ovaire et dans la thyroïde, de fragments de préhypophyse préalablement cultivés *in vitro* pendant 3 à 7 semaines. Ces expériences nous ont permis de constater que les homo-implants deviennent de véritables greffons, bien revascularisés, et qu'ils présentent, dans les conditions de contact direct avec le tissu effecteur, une activité hormonale comparable à celle des transplants non-cultivés préalablement.

Du point de vue cytologique, il convient de distinguer dans nos expériences deux éventualités :

1) Si l'animal receveur est normal, l'implantation est suivie au bout de quelques jours de la récupération des caractères morphologiques disparus en culture : le cytoplasme redevient d'abord très riche en ergastoplasme, puis fortement chromophile. Une corrélation s'est révélée entre la revascularisation de l'explant devenu greffon et cette réapparition massive de granulations chromophiles. L'application des techniques cytologiques nous a permis de constater que dans les greffons de préhypophyse préalablement cultivés, tous les types cellulaires chromophiles se rechargent en granulations (α, β, γ, δ et ε). Une seule exception est à souligner : les cellules δ, en contact direct avec le tissu thyroïdien (dans les conditions de la greffe intrathyroïdienne ou de la greffe combinée hypophyse-thyroïde dans le testicule) restent très pauvres en matériel chromophile.

2) Si l'animal receveur est hypophysectomisé, avant ou après l'implantation, les cellules préhypophysaires – tout en offrant un cytoplasme devenu riche en ergastoplasme et en exerçant les effets *locaux* habituels sur les éléments du testicule et de l'ovaire ou sur les vési-

cules thyroïdiennes, – restent 12 et 14 jours après la greffe encore extrêmement pauvres en granulations sécrétoires. Tout se passe comme si, par suite du déséquilibre endocrinien provoqué par l'hypophysectomie, les cellules de l'explant préhypophysaire devenu homogreffon ne procèdent plus au *stockage* des produits de leur activité élaboratrice.

*

En vue d'une étude des aptitudes fonctionnelles des explants préhypophysaires *in vitro* même, nous les avons associés au testicule, au cortex surrénalien et à la thyroïde.

1) L'association entraîne une faible augmentation du diamètre des cordons testiculaires d'embryon de Poulet de 16 jours. Les mitoses spermatogoniales sont plus nombreuses que dans les expériences de contrôle. Ces modifications sont plus difficilement décelables dès que l'explant préhypophysaire a été cultivé, avant l'association, pendant plusieurs jours.

2) Dans les expériences d'association *in vitro* d'un explant préhypophysaire de Cobaye, préalablement cultivé pendant 1 à 8 jours et d'un fragment de cortex surrénalien de fœtus de Cobaye, le cytoplasme des cellules glomérulaires apparaît hypertrophié et vacuolisé en comparaison avec les résultats des expériences de contrôle. L'étude des ultrastructures montre que les cellules glomérulaires sont le siège des phénomènes de maturation, caractérisés en particulier par la transformation tubulaire des mitochondries.

La réaction des cellules glomérulaires devient plus faible lorsque la durée de culture préalable de la *pars distalis* dépasse 8 jours.

3) Si la durée de culture de la préhypophyse, avant l'association, n'excède pas 6 jours, l'explant thyroïdien fraîchement prélevé chez un embryon de Poulet de 6 jours et demi ou de 7 jours – encore constitué, à ce stade, exclusivement de cordons cellulaires – réagit par la formation de lacunes intercellulaires, larges et très nombreuses après 12 heures d'association. Au bout de 24 à 48 heures, on observe l'apparition de colloïde qui est quantitativement toujours supérieure à celle que l'on constate dans l'explant thyroïdien cultivé à titre de contrôle. Ces modifications sont précédées d'un développement très important de l'ergastoplasme.

Lorsque l'explant thyroïdien provient d'embryons plus âgés, la préhypophyse suscite les mêmes modifications ultrastructurales qu'*in vivo*.

Si la durée de culture préalable de la préhypophyse dépasse 6 jours, ces phénomènes sont bien plus discrets, mais restent évidents après des délais s'échelonnant jusqu'à 40 jours.

Nous avons étudié, dans les mêmes conditions, l'hormonogenèse de la thyroïde embryonnaire de Poulet, prélevée au stade de 14 jours d'incubation. Au moment de son association avec la préhypophyse de Cobaye adulte, on incorpore au milieu de culture de l'^{131}I. Au bout de 16 heures, on mesure la radioactivité des explants thyroïdiens au compteur de Geiger et on fait une analyse radiochromatographique de

l'hydrolysat thyroïdien. La stimulation *in vitro* de l'hormonogenèse thyroïdienne par la préhypophyse s'est traduite, en comparaison avec les expériences de contrôle, par une faible diminution du rapport $\frac{MIT}{DIT}$ (ce rapport étant d'ailleurs toujours plus élevé *in vitro* qu'*in vivo)* et par une augmentation du pourcentage de thyronines (en particulier de thyroxine) allant de pair avec une diminution significative de la radioactivité *totale* telle qu'elle est déterminée au compteur de Geiger. Ces résultats montrent que l'explant préhypophysaire conserve en culture organotypique une activité thyréostimulante. Celle-ci est appréciable si la durée de culture de la préhypophyse, avant son association avec la thyroïde, n'excède pas quelques jours. Elle décroît ensuite, mais il convient de noter que si la durée de culture préalable varie entre 6 et 36 jours, l'intensité de l'activité thyréotrope n'a montré aucune tendance systématique à l'augmentation ou à la diminution.

*

Les résultats de nos expériences apportent donc la démonstration que les cellules préhypophysaires peuvent conserver en culture organotypique une certaine activité fonctionnelle spécifique; la disparition quasi- totale des granulations sécrétoires n'implique nullement un processus de « dédifférenciation »; elle ne fait que traduire un état fonctionnel particulier. Mais nos résultats sont aussi une nouvelle preuve qu'en l'absence des connexions anatomiques et fonctionnelles avec les centres hypothalamiques, l'activité sécréto-excrétrice des cellules préhypophysaires, à l'exception de la fonction lactogénique, est réduite à un fonctionnement « de base ».

La persistance *in vitro* d'une activité fonctionnelle spécifique dans les conditions de nos expériences (l'explant préhypophysaire est cultivé, avant la courte phase finale d'association avec l'organe-effecteur, sur un milieu comportant du sérum de Cobaye hypophysectomisé), ne peut être imputée sans réserve aux seuls facteurs secrétoires propres à la cellule préhypophysaire. En particulier, on ne saurait exclure l'intervention d'éventuels principes sériques d'origine hypothalamique. L'on sait déjà (Fortier et Ward, 1958) que le plasma de Rat présente une activité du type C.R.F. Un milieu de culture comportant du plasma ou du sérum, n'est donc pas *a priori* exempt de principes sériques d'origine hypothalamique. La dilution même du sérum incorporé au milieu de culture n'est pas suffisante pour rejeter la possibilité d'une intervention de tels principes : comme la réponse à des doses décroissantes d'une substance hormonale n'est pas forcément linéaire et que l'on ignore le seuil de réaction de l'effecteur, il est impossible d'éliminer une action éventuelle par une simple dilution.

D'autres recherches faisant appel à des techniques physiologiques s'imposent pour résoudre définitivement le problème du fonctionnement autonome de la préhypophyse.

Laboratoire de Zoologie et Embryologie expérimentale
de la Faculté des Sciences et Institut de Physiologie
de la Faculté de Médecine, Strasbourg (France)

BIBLIOGRAPHIE

Adams A. E., 1946. - Variations in the potency of thyrotrophic hormone of the pituitary in animals. *Quart. Rev. Biol., 21,* 1 - 32.

Alloiteau J. J., 1961. - Le contrôle hypothalamique de l'adénohypophyse. 3. - Régulation de la fonction gonadotrope femelle : activité L.T.H. *In : Histophysiologie du complexe hypothalamo-hypophysaire,* Paris, 215 - 230 (dactyl.) (Séminaires du Collège de France, Chaire d'Histophysiologie, N° 1).

Anderson E. and Haymaker W., 1935. - Elaboration of hormones by pituitary cells growing *in vitro. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 33,* 313 - 316.

Aron C., Asch L. et Gandar R., 1958. - Fluctuations du contenu thyréotrope préhypophysaire et de l'activité thyroïdienne chez le Rat mâle entier ou castré. Contribution à l'étude des rapports entre la sécrétion et l'excrétion. *Arch. Anat. Microsc. Morphol. Exper., 47,* 183 - 204.

Aron M., 1931. - Recherches histophysiologiques sur le fonctionnement et les corrélations des glandes endocrines embryonnaires chez les Vertébrés. *Bull. biol. de la France et de la Belgique, 65,* 439 - 521.

Aron M., 1934. - Les tests morphologiques du fonctionnement thyroïdien. *C. R. Assoc. Anat.,* N° 35, 7 - 22.

Aron M., 1939. - Le fonctionnement de la thyroïde chez l'embryon de Poulet. *C. R. Soc. Biol., 132,* 544 - 545.

Aron M., 1955. - Les greffes intratesticulaires. *Rev. Lyon Med., 4,* 233 - 240.

Aron M. et Petrovic A., 1959. - Contrôle hypothalamique et localisation des sécrétions gonadotrope, thyréotrope et corticotrope dans la glande pituitaire du cobaye mâle. *Arch. Anat. Microsc. Morphol. Exper., 48,* 179 - 230.

Aron M. et Petrovic A., 1960. - Contrôle hypothalamique des sécrétions gonadotrope, corticotrope et thyréotrope dans la glande pituitaire du cobaye femelle. *Arch. Anat. Microsc. Morphol. Exper., 49,* 363 - 394.

Aron M., Petrovic A., Weill C. et Deminatti M., 1953. - Homogreffes dans le testicule du cobaye. *C. R. Acad. Sci., 237,* 753 - 754.

Assenmacher I., 1961. - Le contrôle hypothalamique de l'adéno-hypophyse. 5. - Effets de la section de la tige hypophysaire sur la fonction gonadotrope. *In : Histophysiologie du complexe hypothalamo-hypophysaire,* Paris, 245 - 256 (dactyl.), (Séminaires du Collège de France, Chaire d'Histophysiologie, N° 1).

Baker L. E., 1936. - Artificial media for the cultivation of fibroblasts, epithelial cells and monocytes. *Science, 83.* 605.

Bakker-Sauër E. K., 1961. - Some effects of thyrotropic hormone on thyroid tissue in vitro. *Koninkl. Nederl. Acad. Wetensch., Ser. C, 64,* 86 - 95.

Baud C. A., 1959. - Ultrastructure et fonction de la membrane nucléaire. *Problèmes d'ultrastructures et de fonction nucléaires,* Masson, édit., Paris, 1 - 34.

Benoit J., 1961. - Conceptions actuelles sur les mécanismes du contrôle hypothalamique de l'hypophyse. *In : Histophysiologie du complexe hypothalamo-hypophysaire,* Paris, 326 - 347 (dactyl.), (Séminaires du Collège de France, Chaire d'Histo-physiologie, N° 1).

BENOIT J. et ASSENMACHER I., 1955. - Le contrôle hypothalamique de l'activité préhypophysaire gonadotrope. *J. Physiol. (Paris), 47,* 427 - 567.

BERNHARD W., GAUTIER A. et ROUILLER C., 1954. - La notion de « microsomes » et le problème de la basophilie cytoplasmique. *Arch. Anat. Microsc. Morphol. Exper., 43,* 236 - 275.

BERNHARD W. et ROUILLER Ch., 1956. - Close topographical relationship between mitochondria and ergastoplasma of liver cells in a definite phase of cellular activity. *J. Biophys. Biochem. Cytol., 2* (Suppl.), 73 - 78.

BODON K., 1902. - Die morphologischen und tinktoriellen Veränderungen nekrobiotischer Blutzellen. *Virchow's Arch. Pathol. Anat. u. Physiol., 173,* 485.

BORN G., 1897. - Über Verwachsungsversuche mit Amphibienlarven. *Arch. Entwicklungsmech., 4,* 517 - 623.

BORYSKO E., 1956. - Recent developments in methacrylate embedding. I. A study of polymerization damage phenomenon by phase contrast microscopy. *J. Biophys. Biochem. Cytol., 2,* 4 (Suppl.), 3 - 14.

BRACHET J., 1942. - La localisation des acides pentosenucléiques dans les tissus animaux et les œufs d'amphibiens en voie de développement. *Arch. Biol., 53,* 207 - 257.

BURROWS M. T., 1910. - The cultivation of tissues of the chick-embryo outside the body. *J. Amer. Med. Assoc., 55,* 2057 - 2058.

BURROWS M. T. and CARREL A., 1910. - Cultivation of adult tissue and organs outside the body. *J. Amer. Med. Assoc., 55,* 1379 - 1381.

CARPENTER E., 1942. - Differentiation of chick embryo thyroids in tissue culture. *J. exper. Zool., 89,* 407 - 431.

CARPENTER E., BEATTIE J. et CHAMBERS R. D., 1954. - The uptake of I^{131} by embryonic chick thyroid glands in vivo and in vitro. *J. Exp. Zool., 127,* 249 - 269.

CARREL A., 1912. - On the permanent life of tissues outside of the organism. *J. exper. Med., 15,* 516 - 528.

CARREL A. et BURROWS M. T., 1910. - La culture des tissus adultes en dehors de l'organisme. *C. R. Soc. Biol., 69,* 293 - 294.

CHARLIER J. P., 1961. - Aspects actuels et perspectives d'études des corrélations entre la dent et son environnement par des méthodes de transplantation et de culture organotypique. *Orthodontie Française, 32,* 271 - 279.

CHLOPIN N., 1922. - Über in vitro Kulturen der embryonalen Gewebe der Säugetiere. *Arch. mikr. Anat., 96,* 435 - 493.

CORIN J. et FREDERIC J., 1960. - Contribution de la microscopie en contraste de phase à l'étude de l'hypophyse de Poulet. *Première Réunion Européenne d'Anatomie,* Strasbourg (sous presse).

COURRIER R. et COLONGE A., 1957. - Résultats de greffes hypophysaires chez le Rat. *C. R. Acad. Sci., 245,* 388 - 391.

COURRIER R., COLONGE A., HERLANT M. et PASTEELS J. L., 1961. - Nouvelles recherches histologiques sur les greffes hypophysaires après une survie prolongée chez le Rat hypophysectomisé. *C. R. Acad. Sci., 252,* 645 - 647

DA LAGE C., 1961. - Le contrôle hypothalamique de la fonction gonadotrope. *Actualités endocrinologiques,* 77 - 89.

DALTON A. J. et FELIX M. D., 1956. - A comparative study of Golgi complex. *J. Biophys. Biochem. Cytol., 2* (Suppl.), 79.

DEMINATTI M., 1959. - Recherches cytochimiques sur la teneur en acide ribonucléique des différents types cellulaires de la préhypophyse chez le cobaye. *C. R. Soc. Biol., 153,* 320 - 322.

EAGLE H., 1955. - The specific amino acid requirements of a human carcinoma cell (Strain HeLa) in tissue culture. *J. exper. Med., 102,* 37 - 48.

EAGLE H., 1955. - The minimum vitamin requirements of the L and Hela cells in tissue culture, the production of specific vitamin deficiencies and their cure. *J. exper. Med., 102,* 595 - 600.

ENGEL P. und WERBER E., 1937. - Über das Wachstum der Mäusehypophyse in der Gewebekultur. *Arch. exper. Zellforsch., 20,* 194 - 197.

EULER C. von, and HOLMGREN B., 1956 a. - The thyroxine « receptor » of the thyroid-pituitary system, *J. Physiol. (London), 131,* 125 - 136.

EULER C. von, and HOLMGREN B., 1956 b. - The role of hypothalamo-hypophysial connexions in thyroid secretion. *J. Physiol. (London), 131,* 137 - 146

FARQUHAR M. G. and RINEHART J. F., 1954 a. - Electron microscopic studies of the anterior pituitary gland of castrate rats. *Endocrinol., 54,* 516 - 541.

FARQUHAR M. G. and RINEHART J. F., 1954 b. - Cytologic alterations in the anterior pituitary gland following thyroidectomy. An electron microscope study. *Endocrinol., 55,* 857 - 876.

FELL H. B., 1928. - The development in vitro of the isolated otocyst of the embryonic fowl. *Arch. exper. Zellforschung besonders Gewebezüchtung (Explantation), 7,* 69 - 81.

FELL H. B. and ROBINSON R., 1929. - The growth, development and phosphatase activity of embryonic avian femora and limb-buds cultivated in vitro. *Biochem. J., 23,* 767 - 784.

FEVOLD H. L., HISAW F. L. et LEONARD S. L., 1931. - The gonad stimulating and the luteinizing hormones of the anterior lobe of the hypophysis. *Amer. J. Physiol., 97,* 291 - 301.

FISCHER A., 1922. - Cultures of organized tissue. *J. exper. Med., 36,* 393 - 397.

FISCHER A., ASTRUP T., EHRENSVARD G. and OEHLENSCHLAGER V., 1948. - Growth of animal tissue cells in artificial media. *Proc. Soc. exper. Biol., N. Y., 67,* 40 - 46.

FORTIER C., 1951. - Dual control of adrenocorticotrophin release. *Endocrinol., 49,* 782 - 788.

FORTIER C. and WARD D. N., 1958. - Limitations of the in vitro pituitary incubation system as an assay for ACTH-releasing activity. *Can. J. Biochem. Physiol., 36,* 111 - 118.

FUGO N. W., 1940. - Effects of hypophysectomy in the chick embryo. *J. exper. Zool., 85,* 271 - 297.

FUGO N. W. and WITSCHI E., 1938. - Removal of the hypophysial primordium in the chick during the second day of incubation. *Acta Biol. Latvica, 8,* 73 - 79.

GAILLARD P. J., 1932. - Die ontogenetische Änderung in der Zusammensetzung der Körperflüssigkeiten in Hinblick auf das Wachstum und die Differenzierung von darin gezüchteten Geweben. *Acta Crevia Neerland. physiol. pharmacol. microbiol., 2,* 16 - 19.

GAILLARD P. J., 1935. - Developmental changes in composition of the body fluids in relation to growth and differentiation of tissue cultures. *Protoplasma, 23,* 145 - 174.

GAILLARD P. J., 1937. - Die Glandula hypophysis von Kaninchen in der Gewebezüchtung, ihre Strukturveränderungen und ihr Einfluss auf das Wachstum von mit diesen zusammengezüchteten Kulturen osteogenetischer Zellen. *Protoplasma, 28,* 1 - 17.

GAILLARD P. J., 1938. - An experimental contribution to the origin of the pars intermedia of the hypophysis by combined culturing of anterior and posterior lobe explants. *Acta Neerland. morphol. normal. path., 1,* 3 - 11.

GAILLARD P. J., 1938. - Die Glandula hypophysis des Kaninchens (Pars anterior) in vivo und in vitro. *Arch. exper. Zellforsch.,* 1938 - 1939, *22,* 65 - 67.

GAILLARD P. P., 1942. - Hormones regulating growth and differentiation in embryonic explants. *Actualités Scientif. Industr.*, N° 923, Hermann, édit., Paris, 82 pp.

GAILLARD P. J., 1948. - Growth, differentiation and function of explants of some endocrine glands. *Soc. Exper. Biol. Symposia*, 1948, *2*, 139 - 144.

GAILLARD P. J., 1949. - Germinal or covering epithelium. *3 Journ. Cyto-Embryol. Belgo-Neerland.*, 4 - 9.

GAILLARD P. J., 1951. - Methods for study of organized growth in vitro; organ culture technique using embryologic watch glasses. *In :* VISSCHER, M. B., ed., *Methods in medical research*, Chicago, The Year Book Publishers, *4*, 241 - 246.

GAILLARD P. 1953. - Growth and differentiation of explanted tissues; 4 : Culture of thyroid gland from chick embryos. *Internat. Rev. Cytol., 2*, 361 - 367.

GAILLARD P. J., 1954. - Differentiation phenomena in explants of the embryonic chick thyroid gland. *Acta Phys. Pharm. Neerland., 3*, 439 - 448.

GAILLARD P. J., 1955. - The influence of thyreotropic hormone on the development of embryonic thyroid gland tissue in vitro. *Acta Physiol. Pharmacol. Neerl., 4*, 108.

GAILLARD P. J. et VAROSSIEAU W. W., 1942. - Der Einfluss des Hypophysenvorderlappens auf die morphologische Entwicklung des Hodens (studiert mit Hilfe der kombinierten Gewebezüchtung in vitro). *Arch. exper. Zellforschung, 24*, 141 - 168.

GANONG W. F. and FORSHAN P. H., 1960. - Adenohypophysis and adrenal cortex. *Ann. Rev. Physiol., 22*, 579 - 614.

GARZIĆIĆ B. et ANAF M., 1959. - Diferenciranje tireoidne žlezde fetusa belog pacova in vitro na podlozi bez hipofiznih hormona. *Acta Medica Iugoslavica, 13*, 409 - 423.

GAUTHERET R. J., 1933. - Cultures de cellules détachées de la coiffe. *C. R Acad. Sci., Paris, 196*, 638 - 640.

GELOSO J. P., 1956. - Recherches sur le métabolisme de l'iode radioactif par la thyroïde du fœtus de Rat. *C. R. Soc. Biol., 150*, 3 2140 - 2145.

GEY G. O., 1933. - An improved technic for massive tissue culture. *Amer. J. Cancer, 17*, 752 - 756.

GIROUD A. et DESCLAUX P., 1947. - Topographie cellulaire dans le lobe antérieur de l'hypophyse. *Bull. Histol. Appl., 24*, 73 - 80.

GIROUD A. et MARTINET M., 1948 a. - Rôle des cellules basophiles de l'hypophyse de Bœuf et de Porc dans la production de la thyréostimuline. *C. R. Assoc. Anat., 68*, 540 - 542.

GIROUD A. et MARTINET M., 1948 b. - Sur l'origine de l'hormone corticotrope et de l'hormone gonadotrope. *C. R. Assoc. Anat., 142*, 734 - 735.

GONZALES F., 1954. - Evidence of the functional differentiation of the embryonic chick thyroid in tissue culture. *Texas Reports Biol. Med., 12*, 828 - 832.

GREEP R. O. et FEVOLD H. L., 1937. - The spermatogenic and secretory function of the gonads of hypophysectomized adult rats treated with pituitary F.S.H. and L.H. *Endocrinol., 21*, 611 - 618.

GRUNER J. E., 1961. - La microscopie électronique en neuropathologie humaine. Biopsies cérébrales, nerveuses et musculaires. *Rapport au IV^e Congrès Internationai de Neuropathologie*, Munich, 1961 (sous presse).

GUILLEMIN R., 1956. - Hypothalamic-hypophysial interrelationships in the production of pituitary hormones in vitro. *In : Hypothalamic-hypophysial interrelationships*, Thomas, édit., Springfield, 46 - 57.

GUILLEMIN R., 1959. - Hypothalamic control of the anterior hypophysis and its metabolic implications. *Diabetes, 8*, 352 - 357.

Guillemin R., 1960. - Steriodogenic activities of purified corticotropins and pepsin degradation products of - corticotropin. *Endocrinol., 66,* 819 - 823.

Guillemin R., 1961. - Critères nécessaires pour la caractérisation du facteur hypothalamique de décharge d'ACTH (facteur ACTH-hypophysiotrope ou CRF), 309 - 316. *In : Etudes d'Endocrinologie,* Actual. Scientif. Industr., Hermann, édit., Paris, N° 1286, 350 pp.

Guillemin R. and Rosenberg B., 1955. - Humoral hypothalamic control of anterior pituitary : a study with combined tissue cultures. *Endocrinol., 57,* 599 - 607.

Guillemin R. et Schally A. V., 1959. - Re-evaluation of a technique of pituitary incubation in vitro as an assay for corticotropin releasing factor. *Endocrinol., 65,* 555 - 562.

Guillemin R., Schally A., Andersen R., Lipscomb H. et Long J., 1960. - Sur l'existence de deux types de substances à activité hypophysiotrope : - CRF et - CRF. *C. R. Acad. Sci., Paris, 250,* 4462 - 4464.

Haguenau F., 1958. - The ergastoplasm. *Internat. Rev. Cytol., 7,* 425 - 483.

Haguenau F. et Bernhard W., 1955. - L'appareil de Golgi dans les cellules normales et cancéreuses de vertébrés. Rappel historique et étude au microscope électronique. *Arch. Anat. Microsc. Morphol. Exper., 44,* 27 - 55.

Halmi N. S., 1952. - Two types of basophils in the rat pituitary : « thyrotrophs » and « gonadotrophs » vs. beta and delta cells. *Endocrinol., 50,* 140 - 142.

Hamburger V. and Hamilton H. L., 1951. - A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J. Morphol., 88,* 49 - 92.

Harris G. W., 1949. - The relationship of the nervous system to : a) the neurohypophysis and : b) the adenohypophysis. *J. Endocrinol.,* 6, XVII.

Harris G. W., 1952. - Hypothalamic control of the anterior pituitary gland. *Ciba Found. Coll. Endocrinol., 4,* 106 - 114.

Harris G. W., 1956. - Hypothalamic control of the anterior lobe of the hypophysis. In : Fields-Guillemin-Carton : *Hypothalamic-hypophyseal-interrelationships.* A Symposium, Thomas, édit., Springfield, 31 - 45.

Harrison R. G., 1906 - 1918. - Observations on the living developing nerve fiber. *Anat. Rec., 1,* 116 - 118.

Harven E. de, 1956. - A propos de l'application de certaines colorations histologiques à des tissus fixés par l'acide osmique tamponnée et inclus dans le méthacrylate de butyle. *C. R. Soc. Biol., 150,* 63 - 65.

Hedinger C. E. und Farquhar M. G., 1957. - Elektronenmikroskopische Untersuchungen von zwei Typen acidophiler Hypophysenvorderlappenzellen bei der Ratte. *Schweiz. Z. allg. Pathol. Bakteriol., 20,* 766 - 768.

Herlant M., 1950. - Méthodes nouvelles applicables à l'étude histologique du lobe antérieur de l'hypophyse. *Ann. Endocrinol., 11,* 644 - 647.

Herlant M., 1956. - Corrélations hypophyso-génitales chez la femelle de la Chauve-Souris, Myotis myotis (Borkhausen). *Arch. Biol., 67,* 89 - 180.

Herlant M., 1958. - Les glycoprotéines du lobe antérieur de l'hypophyse. *Ann. d'Histochimie, 3,* 67 - 81.

Herlant M., 1960. - Etude critique de deux techniques nouvelles destinées à mettre en évidence les différentes catégories cellulaires présentes dans la glande pituitaire. *Bull. Micros. appl., 10,* 37 - 44.

Herlant M., 1961. - Quelques notions récentes sur l'histophysiologie de l'antéhypophyse. *In : Histophysiologie du complexe hypothalamo-hypophysaire,* Paris, 143 - 147 (dactyl.), (Séminaires du Collège de France, Chaire d'Histophysiologie, N° 1).

Herlant M. et Pasteels J. L., 1959. - Identification expérimentale des cellules responsables de la sécrétion de prolactine chez le Rat. *C. R. Acad. Sci. Paris, 249,* 2625 - 2626.

INGEBRIGHTSEN R., 1912. - Studies upon the characteristics of different culture media and their influence on tissue outside of the organism. *J. exper. Med., 16,* 421 - 431.

JOLLY J., 1903. - Sur la durée de la vie et de la multiplication des cellules animales en dehors de l'organisme. *C. R. Soc. Biol., 55,* 1266 - 1268.

KASAHARA S., 1935. - On the cultivation in vitro of the hypophysis. *Arch. exper. Zellforsch., 18,* 42 - 76.

KAYSER Ch., 1961. - *The Physiology of Natural Hibernation.* Pergamon Press, London, 325 p.

KAYSER Ch. et PETROVIC A., 1958. - Rôle du cortex surrénalien dans le mécanisme du sommeil hivernal. *C. R. Soc. Biol., 152,* 519 - 522.

VAN DE KERCKHOVE D., 1958. - L'ovaire périnatal de la Souris blanche en culture organotypique. *C. R. Ass. Anat.,* 45e Réunion, Gand, 754 - 759.

KIRKMAN H., 1937. - A cytological study of the anterior hypophysis of guinea pig and a statistical analysis of its cell types. *Amer. J. Anat., 61,* 233 - 283.

KORDON C., 1961. - Le contrôle hypothalamique de l'adénohypophyse. 2. - Régulation de la fonction gonadotrope femelle : activités FSH et L. H. *In : Histophysiologie du complexe hypothalamo-hypophysaire,* Paris, pp. 197 - 214 (Dactyl.). (Séminaires du Collège de France, Chaire d'Histophysiologie, N° 1.)

KUHLMANN N., 1960. - Transplantations auto- et homoplastiques de glandes endocrines et de testicule dans le thymus de Cobaye. *C. R. Soc. Biol., 154,* 776 - 778.

KUNKEL P. et LOEB L., 1935. - Effects of human anterior pituitary gland on sex organs and thyroid of the guinea-pig. *Proc. Soc. Exp. Biol., 32,* 1413 - 1417.

LACOUR F., 1950. - Recherches sur les relations entre les cellules hypophysaires orangées (cellules de Romeis) et les phénomènes de lactation. *C. R. Soc. Biol., 144,* 248 - 249.

LEPINE P., SLIZEWICZ P., DANIEL P. et PACCAUD M., 1956. - Cultures cellulaires dans un milieu utilisant l'hydrolysat de caséine comme source d'acides aminés. *Ann. Institut Pasteur, 90,* 654 - 656.

LEVER J. D. and PETERSON R. R., 1960. - Cellular identities in the pars distalis of the rat pituitary. *Trans. N. Y. Acad. Sci., 22,* 504 - 508. Proc. N. Y. Acad. Sci.

LIBERT O., 1961. - Le contrôle hypothalamique de l'adénohypophyse. 4. - Régulation de la fonction thyréotrope. *In : Histophysiologie du complexe hypothalamo-hypophysaire,* Paris, pp. 231 - 244 (Dactyl.). (Séminaires du Collège de France, Chaire d'Histophysiologie, N° 1.)

LISON L., 1958. - *Statistique appliquée à la biologie expérimentale. La planification de l'expérience et l'analyse des résultats.* Gauthier-Villars, édit., Paris, 346 pp.

LOEB L., 1902. - Über das Wachstum des Epithels. *Arch. f. Entwickelungsmechanik der Organismen, 13,* 487 - 506.

LOEB L., 1932. - Effects of anterior pituitary from various species on sex and thyroid of immature guinea-pigs. *Proc. Soc. Exp. Biol., 29,* 1128 - 1131.

LOSTROH A. J., 1959. - The response of ovarian explants from post-natal mice to gonadotropins. *Endocrinol., 65,* 124 - 132.

LOSTROH A. J., 1960. - In vitro response of mouse testis to human chorionic gonadotropin. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 103,* 25 - 27.

MARAUD R. et STOLL R., 1961. - Sur la fonction thyroïdienne chez l'embryon des vertébrés amniotes. *Biologie Médicale, 50,* 313 - 352.

MARTINDALE F. M., 1941. - Initiation and early development of thyrotropic function in the incubating chick. *Anat. Rec., 79,* 373 - 393.

Martinovitch P. N., 1953. - A modification of the wath glass technique for the cultivation of endocrine glands of infantile rats. *Exp. Cell Res., 4,* 490 - 493.

Martinovic P., 1954. - Istrazivanja na pituitarnim zlezdama infantilnih pacova kultivisanim in vitro i kalemljenih u prednjn komorn oka hipofizektomiranih zivotinja. *Arh. Biol. Nauka, 6,* 299 - 314.

Martinovitch P. N., 1961. - Explants and explant-transplants of infantile rat pituitary glands (pp. 45 - 60). *In : La culture organotypique,* Colloques Internat. C. N. R. S., Paris, 282 pp.

Martinovitch P. N. and Radivojevitch D. V., 1955. - Long-term transplants of infantile rat pituitary cultivated « in vitro » and grafted into the anterior eye chamber of young cats. *Nature (London), 176,* 699 - 700.

Martinovitch P. N. and Pavic D., 1960. - Functional pituitary transplants in rats. *Nature (London), 185,* 155 - 156.

Maximow A., 1925. - Tissue cultures of young mammalian embryos. *Contr. Embr., Carnegie Inst. Washington, 16,* pp. 47 - 113.

Mayer G., 1961. - Fonction gonadotrope des greffes hypophysaires chez la femelle (étude sur la Ratte). *In : Histophysiologie du complexe hypothalamo-hypophysaire,* Paris, pp. 257 - 280 (dactyl.). (Séminaires du Collège de France, Chaire d'Histophysiologie, N° 1.)

Melnick J. L., 1955. - Tissue culture techniques and their application to original isolation growth, and assay of poliomyelitis and orphan viruses. *Ann. N. Y. Acad. Sci., 61,* 754 - 772.

Morgan J. F., Morton H. J. and Parker R. C., 1950. - Nutrition of animal cells in tissue culture. I. Initial studies on a synthétic medium. *Proc. Soc. Exper. Biol., 73,* 1 - 8.

Moszkowska A., 1956. - Activité gonadotrope de l'antéhypophyse d'embryon de Poulet. Etude in vitro. *Arch. Anat. Micros. Morphol. Exper., 45,* 65 - 76.

Moszkowska A., 1961. - Activité de l'antéhypophyse en culture organotypique : la fonction gonadotrope. *In : Histophysiologie du complexe hypothalamo-hypophysaire,* Paris, pp. 299 - 309 (Dactyl.). (Séminaires du Collège de France, Chaire d'Histophysiologie, N° 1.)

Palade G. E., 1952. - The fine structure of mitochondria. *Anat. Rec., 114,* 427 - 449.

Palade G. E., 1952. - A study of fixation for electron microscopy. *J. exp. Med., 95,* 285 - 298.

Palade G. E., 1953. - An electron microscope study of the mitochondrial structure. *J. Histochem. Cytochem., 1,* 188 - 211.

Palade G. E., 1955. - A small particulate component of the cytoplasm. *J. Biophys. Buchem. Cytol., 1* (1), 59 - 68.

Palade G. E., 1956. - The endoplasmic reticulum. *J. Biophys. Biochem. Cytol., 2,* 4 Suppl., 86 - 98.

Palade G. E. and Siekevitz P., 1956. - Liver microsomes. An integrated morphological and biochemical study. *J. Biophys. Biochem. Cytol., 2,* 171 - 200.

Palay S. L., 1958. - The morphology of secretion (pp. 305 - 342). *In : Frontiers in Cytology,* Yale Universit Press, 529 pp.

Pasteels J. L., 1961. - Secrétion de prolactine par l'hypophyse en culture de tissus. *C. R. Acad. Sci. Paris, 255,* 2140 - 2142.

Pasteels J. L. et Mulnard J., 1961. - Caractères morphologiques d'explants hypophysaires cultivés in vitro. *C. R. Acad. Sci., Paris, 255,* 1985 - 1987.

Pavlovic M., Michel R. et Roche J., 1956a. - Sur l'activité hormonogène de cultures de corps thyroïde de jeunes rats. *C. R. Soc. Biol., 150,* 1673 - 1676.

PAVLOVIC M., MICHEL R. et ROCHE J., 1956b. - Culture de corps thyroïde de jeunes rats en présence d'antéhypophyse et hormonogenèse thyroïdienne. *C. R. Soc. Biol., 150,* 1723 - 1726.

PETROVIC A., 1954. - Recherches sur le mode d'action gonadostimulante de la préhypophyse sur le testicule chez le Cobaye. *Thèse de Doctorat en Médecine,* Nouvel Alsacien, édit., Strasbourg, 76 pp.

PETROVIC A., 1955. - Greffes préhypophysaires intratesticulaires chez le Rat. particularités de leur action sur les éléments du testicule par comparaison avec les effets des greffes chez le Cobaye. *C. R. Soc. Biol., 149,* 576 - 578.

PETROVIC A., 1959a. - Modalités évolutives d'explants préhypophysaires de Cobaye en culture in vitro. La notion de « pseudanamorphisme ». *C. R. Ass. Anat.,* Communication présentée à la 46e Réunion de l'Ass. Anat., Montpellier, 22 - 26. 3. 59 (sous presse).

PETROVIC A., 1959a. - Etude cytologique, au microscope électronique, d'explants préhypophysaires cultivés in vitro. *C. R. Acad. Sci., Paris, 249,* 1270 - 1271.

PETROVIC A., 1960a. - Culture organotypique et homogreffe intratesticulaire de fragments du cortex surrénal chez le Cobaye. *C. R. Soc. Biol., 154,* 1077 - 1079.

PETROVIC A., 1960b. - Association, en culture organotypique, de fragments de préhypophyse et de cortico-surrénale de Cobaye. *C. R. Soc. Biol., 154,* 1622 - 1624.

PETROVIC A. et ARON M., 1957. - Recherches par la méthode des greffes sur le fonctionnement de la préhypophyse fœtale de Cobaye. *C. R. Ass. Anat., N° 92,* 1159 - 1164.

PETROVIC A. et ARON M., 1958. - Maintien de la fonction gonadostimulante de greffons préhypophysaires intratesticulaires chez le Cobaye hypophysectomisé. *C. R. Soc. Biol., 152,* 144 - 146.

PETROVIC A. et HAY D., 1961. - Action directe de fragments d'hypothalamus de Cobaye adulte sur la thyroïde de l'embryon de Poulet de 14 jours en culture organotypique. *C. R. Acad. Sci. Paris, 253,* 1867 - 1869.

PETROVIC A. et HEUSNER A., 1961. - Oxygénation d'un fragment d'organe *in vitro :* principe de culture organotypique en suspension dans la phase liquide. *C. R. Acad. Sci., Paris, 253,* 3066 - 3067.

PETROVIC A. et KAYSER Ch., 1956. - Etude de l'activité gonadotrope de la préhypophyse du Hamster (Cricetus cricetus) en hiver et en été. *C. R. Soc. Biol., 150,* 1990 - 1992.

PETROVIC A. et KAYSER Ch., 1957. - L'activité gonadotrope de la préhypophyse du Hamster (Cricetus cricetus) au cours de l'année. *C. R. Soc. Biol., 151,* 996 - 998.

PETROVIC A. et KAYSER (Ch.), 1958. - Variations saisonnières du seuil réactionnel de la thyroïde à la thyréostimuline chez le Hamster (Cricetus cricetus). *J. Physiol. (Paris), 50,* 446 - 450.

PETROVIC A. et LAVILLAUREIX J., 1957. - Greffe intratesticulaire de fragments de préhypophyse préalablement cultivés in vitro. *C. R. Soc. Biol., 151,* 998 - 1001.

PETROVIC A. et LAVILLAUREIX J., 1958. - Réussite d'homogreffes intraovariennes de fragments préhypophysaires préalablement cultivés in vitro. *C. R. Soc. Biol., 152,* 642 - 644.

PETROVIC A. et LAVILLAUREIX J., 1959. - Homogreffes intraovariennes, chez le Cobaye, de fragments de préhypophyse préalablement cultivés in vitro. *C. R. Ass. Anat., 104,* 647 - 651.

PETROVIC A. et LAVILLAUREIX J., 1959. - Homogreffe intrathyroïdienne, chez le Cobaye, de fragments de préhypophyse préalablement cultivés in vitro. *C. R. Soc. Biol., 153* 688 - 690.

Petrovic A., Weill C. et Deminatti M., 1953a. - Implantation de fragments préhypophysaires dans le testicule de cobayes prématures. Leur action sur la glande interstitielle et sur les cellules sexuelles. *C. R. Soc. Biol., 147,* 495 - 497.

Petrovic A., Weill C. et Deminatti M., 1953b. - Réussite de greffes glandulaires homoplastiques dans le testicule du cobaye. *C. R. Soc. Biol., 147,* 1814 - 1816.

Porte A., 1960. - Contribution de la microscopie électronique à l'étude de la cellule plasmocytaire. Morphogénèse, sécrétion et stockage de glycoprotéines. *Thèse Doct. Med.,* Strasbourg, 58 pp. (dactyl.).

Porter K. R., 1960. - Problems in the study of nuclear fine structure. *4. Intern. Kong. für Elektronenmikr.,* Berlin 10 - 17 Sept. 1958, herausg. von Bargmann, Verhandl., Band II, Springer, édit., Berlin 186 - 199.

Purves H. D. and Griesbach W. E., 1951. - The site of thyrotrophin and gonadotrophin production in the rat pituitary studied by the McManns-Hotchkiss-staining for glycoprotein. *Endocrinol., 49,* 244 - 264.

Purves H. D. et Griesbach W. E., 1951. - The significance of the Gomori staining of the basophils of the rat pituitary. *Endocrinol., 49,* 652 - 662.

Racadot J., 1959. - Les cellules thyréostimulantes du lobe antérieur de l'hypophyse chez le Chat. *Ann. Endocrinol., 20,* 550 - 556.

Racadot J., 1961. - La fonction thyréotrope de l'hypophyse et son contrôle hypothalamique. *Actualités endocrinologiques,* pp. 157 - 167.

Racadot J., 1961. - Les types cellulaires du lobe antérieur de l'hypophyse de Mammifères. *In : Histophysiologie du complexe hypothalamo-hypophysaire.* Paris, 1961 (dactyl), pp. 72 - 82. (Séminaires du Collège de France, Chaire d'Histophysiologie, N° 1.)

Rebel A. et Marescaux J., 1958. - Recherche, par la méthode des greffes intra-thyroïdiennes, sur l'origine de la thyréostimuline préhypophysaire. *C. R. Soc. Biol., 152,* 810 - 812.

Rebel A. et Marescaux J., 1960. - La signification de la cellule aldéhyde-fuchsine de Gomori de la pars distalis de l'hypophyse. *1re Réunion Européenne d'Anatomie,* Strasbourg (sous presse).

Roche J., Dellour G. H., Michel R. et Velez E., 1953. - Contribution à l'étude du rôle de l'hypophyse sur la biosynthèse de l'hormone thyroïdienne. *C. R. Soc. Biol., 147,* 270 - 274.

Roux W., 1885. - Beiträge zur Entwicklungsmechanik des Embryo. *Z. Biol., 21,* p. 411.

Saffran M. and Schally A. V., 1955. - The release of corticotrophin by anterior pituitary tissue in vitro. *Canad. J. Biochem. and Physiol. 33,* 408 - 415.

Saffran M., Schally A. V. and Benfey B. G., 1955. - Stimulation of the release of corticotropin from the adenohypophysis by a neurohypophysial factor. *Endocrinol., 57,* 439 - 444.

Sayers M. A., Sayers A. and Woodbury L., 1948. - The assay of adrenocortitrophic hormone by the adrenal ascorbic acid depletion method. *Endocrinol., 42,* 379.

Schaberg A., 191. - Adrenal cortex and anterior hypophysis in vitro (pp. 33 - 44). *In : La culture organotypique,* Coll. Internat. C. N. R. S., Paris, 282 pp.

Smith Ph. E., 1926. - Ablation and transplantation of the hypophysis in the rat. *Anat. Rec., 32,* 221.

Soulairac A., 1961. - Le contrôle hypothalamique de l'adénohypophyse. 1. Régulation de la fonction gonadotrope mâle. *In : Histophysiologie du complexe hypothalamo-hypophysaire.* Paris, pp. 192 - 196 (dactyl.). (Séminaires du Collège de France, Chaire d'Histophysiologie, N° 1.)

STOLL R., 1939. - L'agénésie de l'hypophyse et de la thyroïde est sans influence sur le développement de l'embryon de Poulet. *C. R. Soc. Biol., 130,* 926.

STOLL R., MARAUD R., BLANQUET P., MOUNIER J. et LACHAPEL A. O., 1958. - Nouvelles données sur la physiologie thyroïdienne étudiée avec le microscope électronique. *Ann. Endocrinol., 19,* 183 - 201.

STOLL R., MARAUD R. et SPARFEL A., 1959. - Recherches sur le rôle des cytomembranes dans le développement de la thyroïde et dans ses tumeurs. *Arch. Anat. Microsc. Morphol. Exper., 48,* 1 - 2.

STUTINSKY F., 1956. - Rapports du neurosécrétat hypothalamique avec l'adénohypophyse dans des conditions normales et expérimentales. *Pathophysiologia Diencephalica,* Symposium International, Milan, Mai 1956, 78 - 103.

THOMPSON K. W., VINCENT M. M., JENSEN F. C., PRICE R. T. and SCHAPIRO E., 1959. - Production of hormones by human anterior pituitary cells in serial culture. *Porc. Soc. Exper. Biol. Med., 102,* 403 - 408.

THOMSON D., ELBIN C. E. and CANTAB D. P., 1914. - Some further researches on the cultivation of tissues in vitro. *Proc. Roy. Soc. Med., 7,* 21 - 46.

TIXIER-VIDAL A., 1958a. - Etude histophysiologique des relations hypophyse et thyroïde chez l'embryon de Poulet. *Arch. Anat. Microsc. Morphol. Exper., 47,* 235 - 240.

TIXIER-VIDAL A., 1958b. - Répartition du radio-iode et de la thyroxine marquée entre les hématies et le plasma du sang chez le Canard adulte, le Poussin et l'embryon de Poulet. *C. R. Acad. Sci. Paris, 247,* 1665 - 1667.

TIXIER-VIDAL A. et ASSENMACHER I., 1958. - Données préliminaires sur le fonctionnement thyroïdien du Canard Pékin mâle, étudié à l'aide du radioiode ^{131}I. *C. R. Acad. Sci. Paris, 247,* 2035 - 2038.

TROWELL O. A., 1959. - The culture of mature organs in a synthetic medium. *Exptl. Cell Res., 16,* 118 - 147.

VIVIEN J. H. et SCHOTT J., 1958. - Contribution à l'étude des corrélations hypothalamo-pituitaires chez les batraciens. Le contrôle de l'activité gonadotrope. *J. Physiol. (Paris), 50,* 561 - 563.

VOGELAAR J. P. M. and ERLICHMAN E., 1933. - A feeding solution for cultures of human fibroblasts. *Amer. J. Cancer, 18,* 28 - 38.

VULPIAN M. A., 1859 - Note sur les phénomènes de développement qui se manifestent dans la queue de très jeunes embryons de grenouille après qu'on l'a séparée du corps par une section transversale. *C. R. Acad. Sci. Paris, 48,* 807 - 811.

WHITE P. R., 1946. - Cultivation of animal tissue in vitro in nutrients of precisely known constitution. *Growth, 10,* 231 - 289.

WINKLER H., 1907. - Über Pfropfbastarde und pflanzliche Chimären. *Ber. deutsch. botan. Gesellsch., 25,* 568 - 576.

WOLFF E., 1950. - Le rôle des hormones embryonnaires dans la différenciation sexuelle des Oiseaux. *Arch. Anat. Micros. Morphol. Exper., 39,* 426 - 450.

WOLFF E., 1954. - Potentialités et affinités des tissus révélées par la culture in vitro d'organes en associations hétérogènes et xénoplastiques. *Bull. Soc. Zool. France, 79,* 357 - 368.

WOLFF E. et HAFFEN K., 1952. - Sur une méthode de culture d'organes embryonnaires « in vitro ». *Texas Reports on Biology and Medicine, 10.* 463 - 472.

WOLFF E. et MARIN L., 1960. - Sur les facteurs qui déterminent la transformation d'une culture d'organes en culture de tissus. *C. R. Acad. Sci. Paris, 150,* 609 - 611.

Wolff E. et Stoll R., 1937. - L'influence de l'hypophyse sur le développement embryonnaire des Poulets, d'après l'étude expérimentale des Cyclocéphales. *C. R. Soc. Biol., 126,* 1215.

Wolff E. et Weniger J. P., 1953. - Sur les associations xénoplastiques de gonades embryonnaires de Canard et de Souris, en culture in vitro. *C. R. Acad. Sci., 237,* 936 - 938.

Wolff E. et Weniger J., 1954. - Recherches préliminaires sur les chimères d'organes embryonnaires d'Oiseaux et de Mammifères en culture in vitro. *J. Embryo. Exp. Morphol., 2,* 161 - 171.

Wolff E., Haffen K. et Dieterlen F., 1960. - Influence des états nutritionnels sur la différenciation et le fonctionnement des glandes endocrines embryonnaires. *Ann. Nutr. Aliment., 14,* B 11 - B 20.

Zaaijer J. J. P., 1958. - The effect of epithelium on the in vitro development of embryonic limb-bones of human origin. *Kkl. nederl. Akad. Wetensch. Proc., Ser C, 61,* 255 - 264.

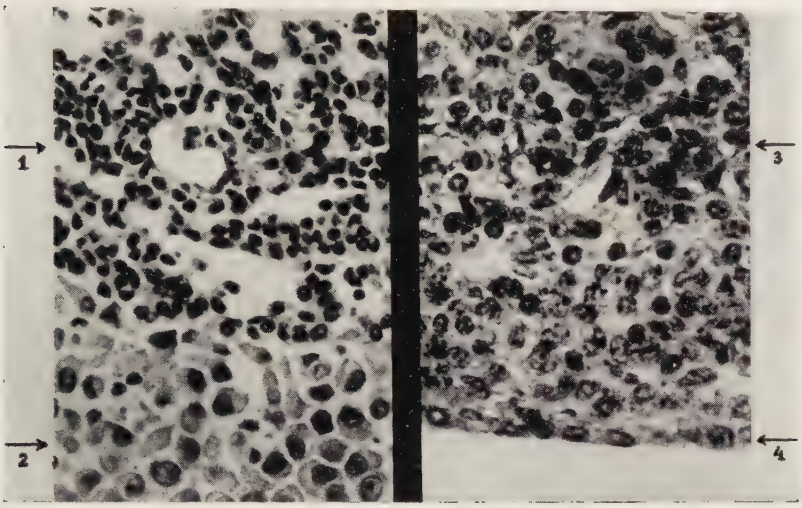


Fig. 1 - Fragments préhypophysaires prélevés chez un Cobaye adulte et cultivés sur le milieu semi-synthétique pendant 4 semaines.

A droite : cellules de l'explant d'origine (3) et la « membrane » périphérique unicellulaire (4), après 4 semaines de culture par le procédé N° 2 (culture sur le milieu gélose-liquide semi-synthétique).

A gauche : cellules constitutives de l'explant d'origine (1) et le halo de cellules en prolifération centrifuge (2) après 4 semaines par le procédé N° 1 (culture en tubes tournants). Gross. : × 520.

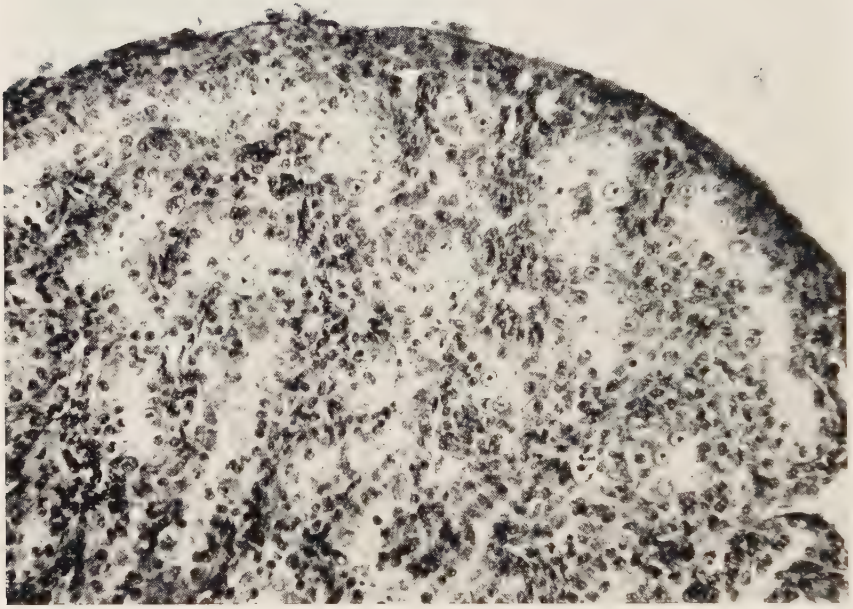


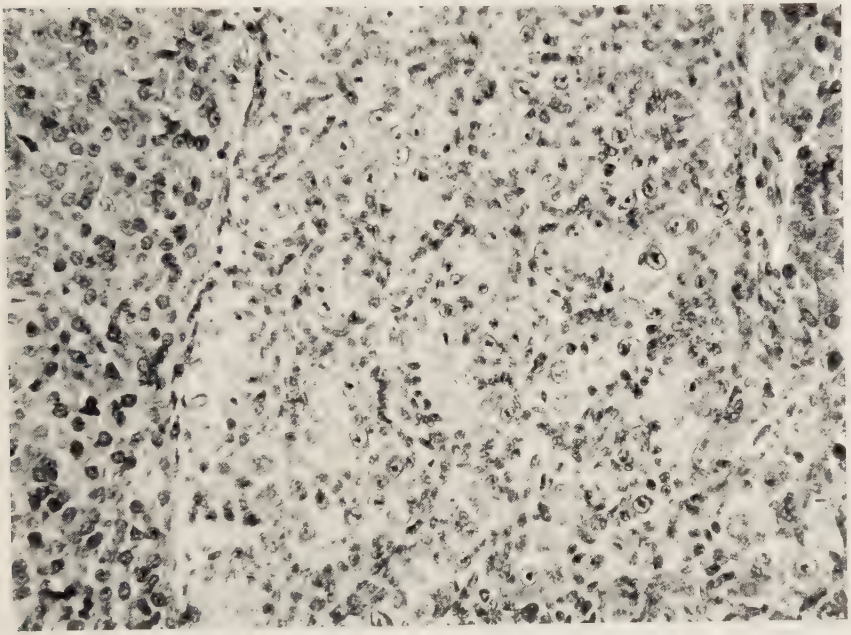
Fig. 2 - Fragment testiculaire prélevé chez un embryon de Poulet de 16 jours et cultivé pendant 3 jours sur le milieu anhormonal. Les cordons sexuels renferment les cellules de Sertoli et quelques spermatogonies. Gross. : × 320.

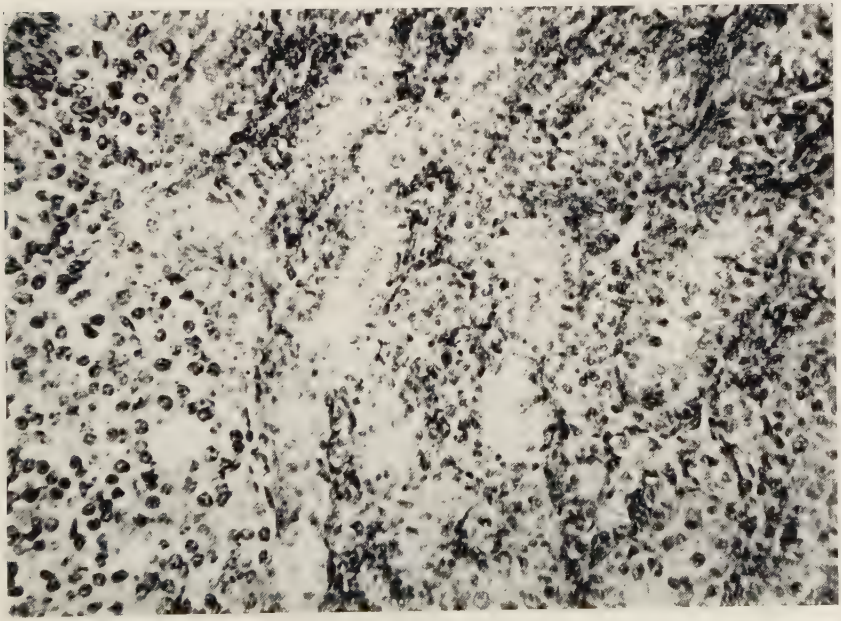
Fig. 3 - Fragment testiculaire d'embryon de Poulet au stade de 16 jours, associé sur le milieu anhormonal pendant 3 jours, avec deux explants préhypophysaires (région antérieure de *pars distalis*) de Cobaye mâle adulte, préalablement cultivés durant 3 jours sur le milieu semi-synthétique.

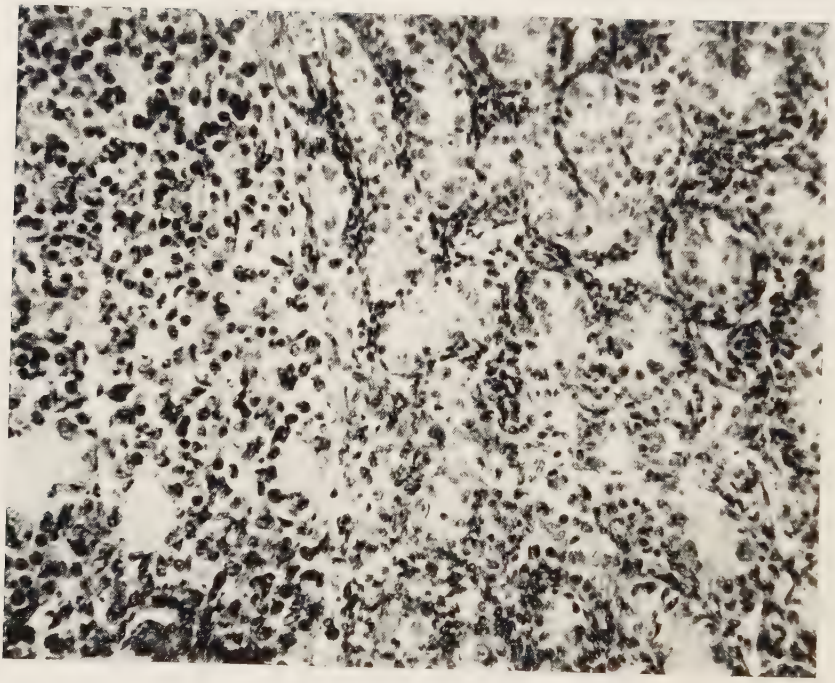
Cordons sexuels de l'explant testiculaire sont par rapport au témoin plus riches en spermatogonies. Gross. : × 320.

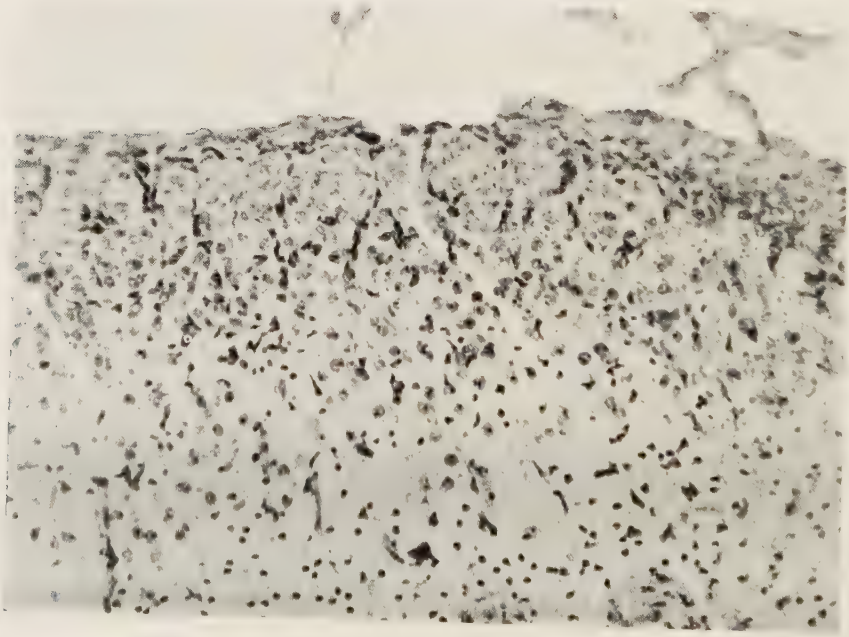
Fig. 4 - Fragment testiculaire d'embryon de Poulet au stade de 16 jours, associé sur le milieu anhormonal pendant 3 jours avec deux explants préhypophysaires (région antérieure de *pars distalis*) de Cobaye mâle adulte, préalablement cultivés durant 14 jours sur le milieu semi-synthétique.

Cordons sexuels situés au contact de l'explant préhypophysaire sont légèrement plus riches en spermatogonies que les cordons plus éloignés. Gross. : × 320.









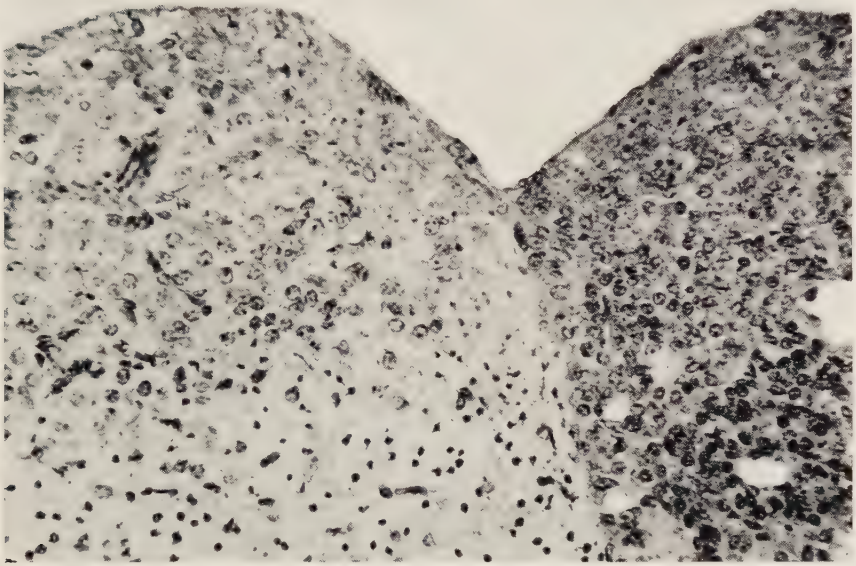


Fig. 7 - Explant corticosurrénalien de fœtus de Cobaye en fin de gestation associé pendant 5 jours sur le même milieu avec un explant préhypophysaire (région postéro-latérale) de Cobaye adulte, préalablement cultivé durant 6 jours sur le milieu semi-synthétique. Cellules glomérulaires hypertrophiées. Nécrose des cellules de la zone fasciculée. Gross. : × 320.

Fig. 5 - Fragment testiculaire d'embryon de Poulet au stade de 16 jours, associé sur le milieu anhormonal pendant 3 jours, avec deux explants préhypophysaires (région antérieure de la *pars distalis*) de Cobaye mâle adulte, préalablement cultivés durant 14 jours sur le milieu semi-synthétique additionné d'un extrait de cerveau fœtal.
Cordons sexuels pratiquement identiques à ceux de l'explant témoin. Gross. : × 320.

Fig. 6 - Explant corticosurrénalien de fœtus de Cobaye en fin de gestation, cultivé seul pendant 5 jours sur le mélange « milieu semi-synthétique — extrait de cerveau fœtal ». Cellules glomérulaires conservées, cellules de la zone fasciculée en nécrose. Gross. : × 320.

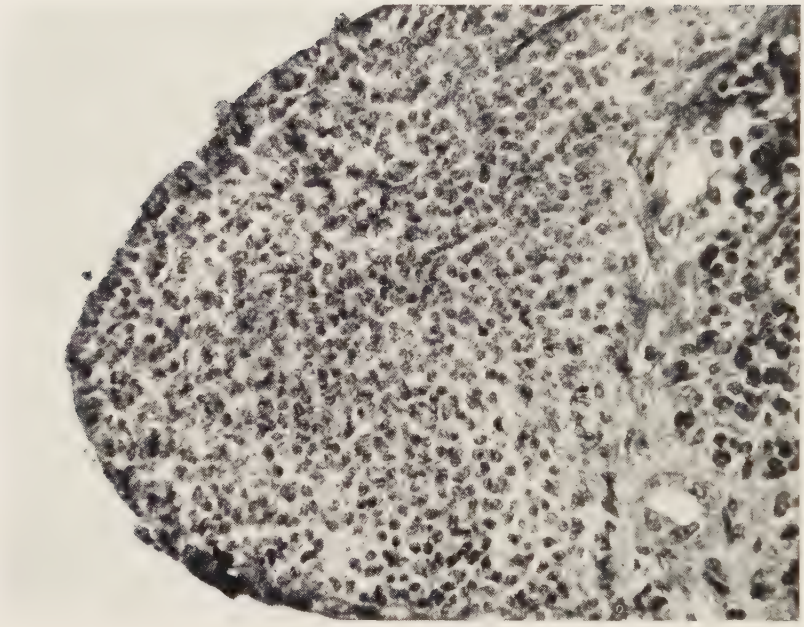
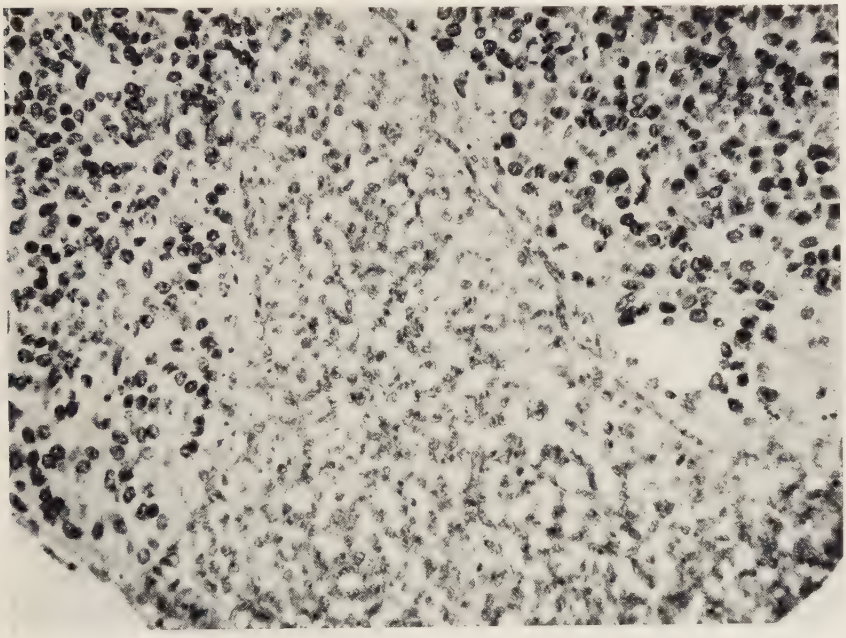
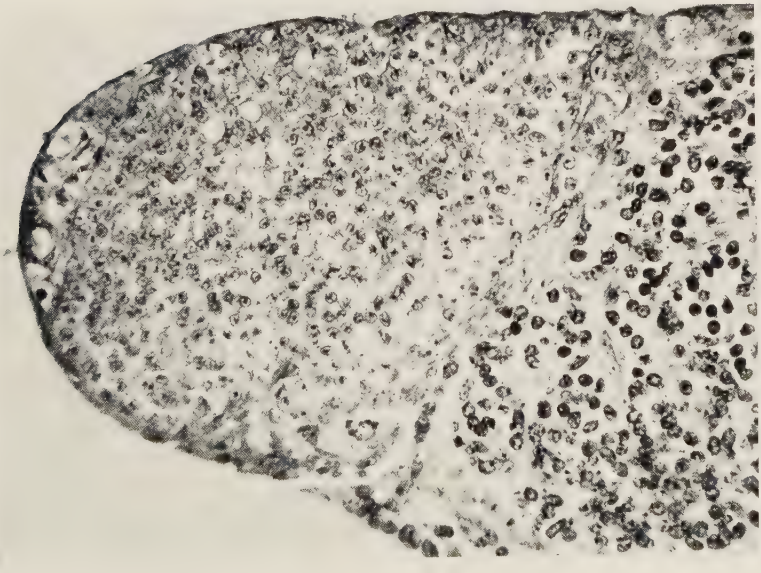


Fig. 8 - Association sur le milieu anhormonal, pendant 24 heures, d'un explant préhypophysaire de Cobaye adulte, préalablement cultivé sur le milieu semi-synthétique pendant 5 jours, avec la thyroïde d'embryon de 6 jours et demi. Le fragment préhypophysaire a été prélevé dans la région postéro-latérale de la *pars distalis*. Coloration à l'hématoxyline-éosine. L'explant préhypophysaire est formé exclusivement de cellules d'aspect chromophobe. L'explant thyroïdien est dépourvu de lacunes intercellulaires. Gross. : × 320.

Fig. 9 - Association sur le milieu anhormonal, pendant 24 heures, d'un explant préhypophysaire de Cobaye adulte, préalablement cultivé sur le milieu semi-synthétique pendant 4 jours, avec la thyroïde d'embryon de Poulet de 6 jours et demi. Le fragment préhypophysaire a été prélevé dans la région antérieure de la *pars distalis*. Coloration à l'hématoxyline-éosine. L'explant préhypophysaire est formé exclusivement de cellules d'aspect chromophobe. L'explant thyroïdien présente de très nombreuses lacunes intercellulaires chromophobes. Gross. : × 320.

Fig. 10 - Association, sur le milieu anhormonal, pendant 24 heures, d'un explant préhypophysaire de Cobaye adulte, préalablement cultivé sur le milieu semi-synthétique pendant 37 jours, avec la thyroïde d'embryon de Poulet de 6 jours et demi. Le fragment préhypophysaire a été prélevé dans la région antérieure de la *pars distalis*. Coloration à l'hématoxyline-éosine. L'explant préhypophysaire est formé exclusivement de cellules d'aspect chromophobe. L'explant thyroïdien présente plusieurs lacunes intercellulaires chromophobes. Gross. : × 320.





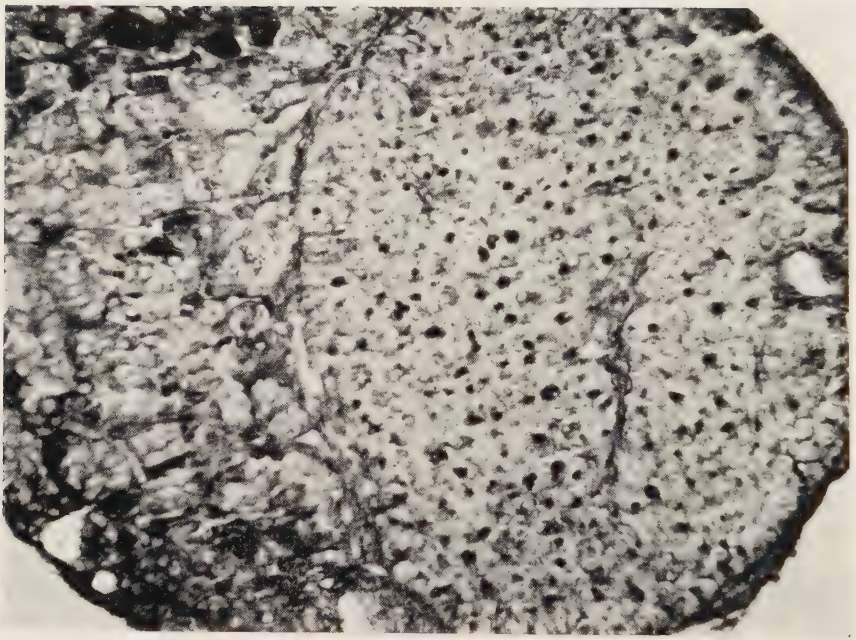
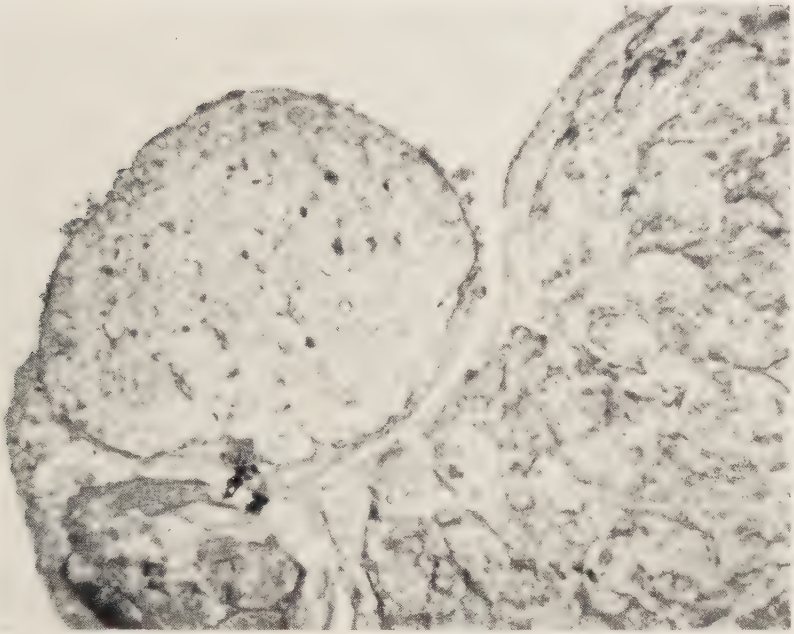
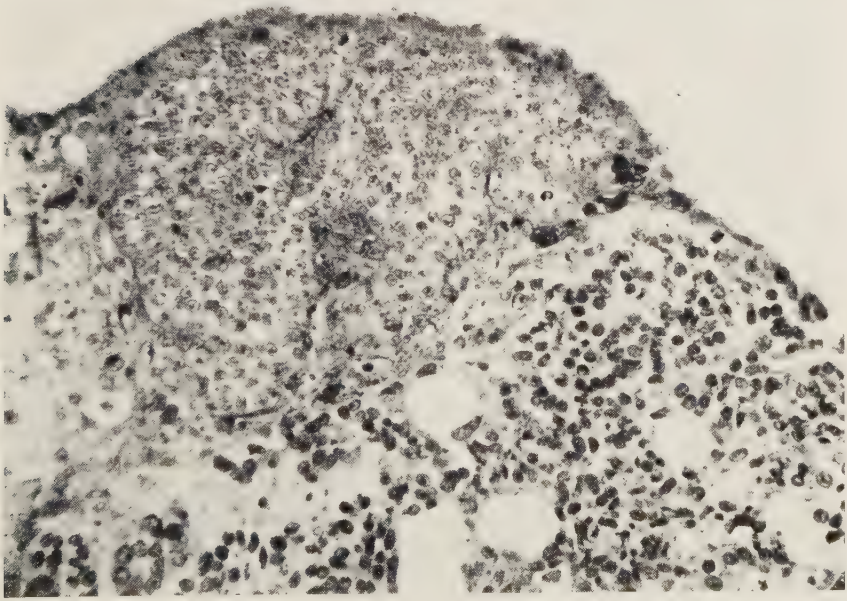


Fig. 11 - Association, sur le milieu anhormonal, pendant 48 heures, d'un explant préhypophysaire, fraîchement prélevé chez un Cobaye adulte, avec la thyroïde d'embryon de Poulet de 7 jours. Le fragment préhypophysaire a été prélevé dans la région antérieure de la *pars distalis*. Coloration à la fuchsine-paraldéhyde de Gomori. L'explant préhypophysaire renferme encore des cellules à cytoplasme fuchsine-paraldéhyde-positif. L'explant thyroïdien présente de très nombreuses gouttelettes de colloïde. Gross. : × 320.

Fig. 12 - Association, sur le milieu anhormonal, pendant 48 heures, d'un explant préhypophysaire de Cobaye adulte, préalablement cultivé sur le milieu semi-synthétique pendant 37 jours, avec la thyroïde d'embryon de Poulet de 7 jours. Le fragment préhypophysaire a été prélevé dans la région antérieure de la *pars distalis*. Coloration à la fuchsine-paraldéhyde de Gomori. L'explant préhypophysaire est formé exclusivement de cellules d'aspect chromophobe. L'explant thyroïdien présente, à côté de quelques lacunes intercellulaires chromophobes, plusieurs gouttelettes de colloïde. Gross. : × 320.

Fig. 13 - Association sur le milieu anhormonal, pendant 24 heures, d'un explant préhypophysaire (région antérieure) de Cobaye adulte, préalablement cultivé durant 21 jours sur le mélange « milieu semi-synthétique — extrait de cerveau fœtal », avec la thyroïde d'embryon de Poulet de 6 jours et demi. L'explant thyroïdien présente quelques très rares lacunes chromophobes intercellulaires. Gross. : × 320.





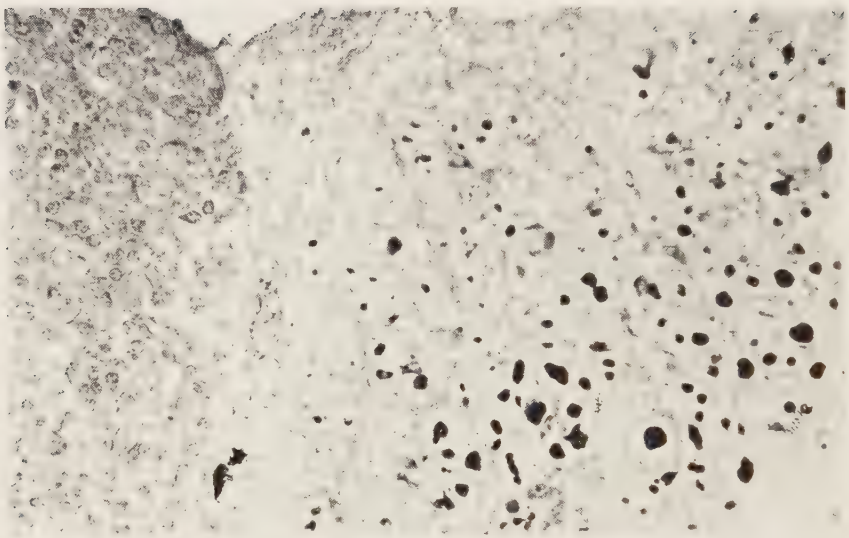
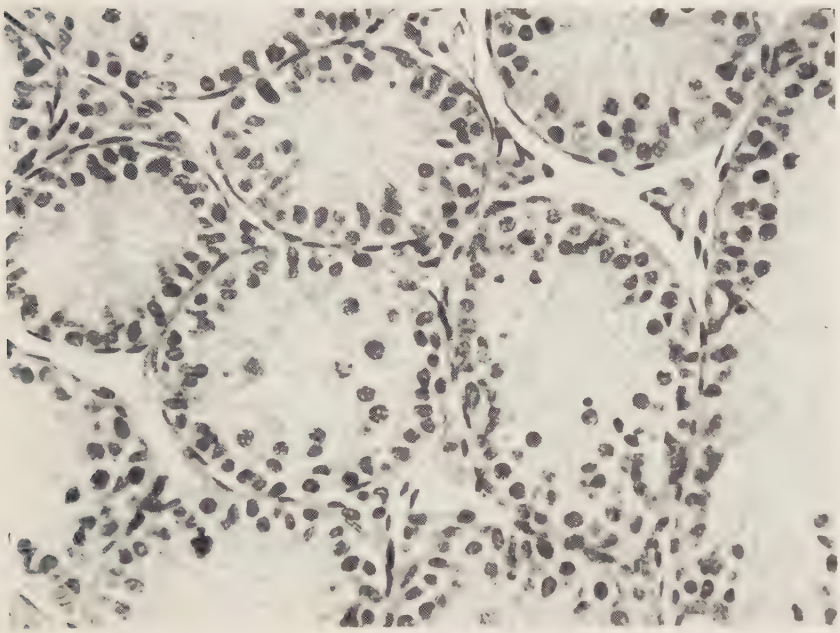
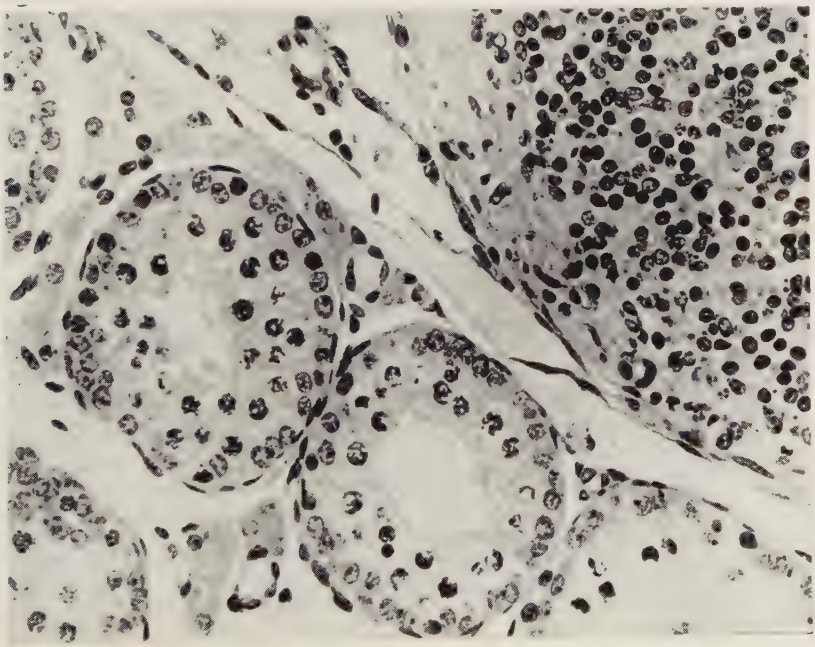


Fig. 14 - Association sur le milieu anhormonal, pendant 36 heures, d'un explant préhypophysaire (région antérieure) de Cobaye adulte, préalablement cultivé pendant 6 jours sur le milieu semi-synthétique, avec un fragment thyroïdien de fœtus de Cobaye de 8 cm et demi. Les vésicules thyroïdiennes situées au voisinage de l'explant préhypophysaire présentent un épithélium plus élevé et une colloïde moins abondante (image de stimulation). Gross. : × 320.

Fig. 15 - Testicule non-inoculé d'un jeune Cobaye, dont le testicule controlatéral (fig. 16) est porteur d'un greffon préhypophysaire. Tubes séminifères en prespermatogenèse (spermiogenèse à peine débutante). Gross. : × 320.

Fig. 16 - Homogreffe intratesticulaire d'un explant préhypophysaire de Cobaye préalablement cultivé sur le milieu semi-synthétique pendant 3 semaines. Testicule porte-greffon 2 jours après l'inoculation. Le cytoplasme des cellules de l'implant est toujours dépourvu de granulations chromophiles. La glande interstitielle testiculaire est déjà notablement hypertrophiée. Tubes séminifères légèrement stimulés par rapport au testicule témoin. Gross. : × 320.





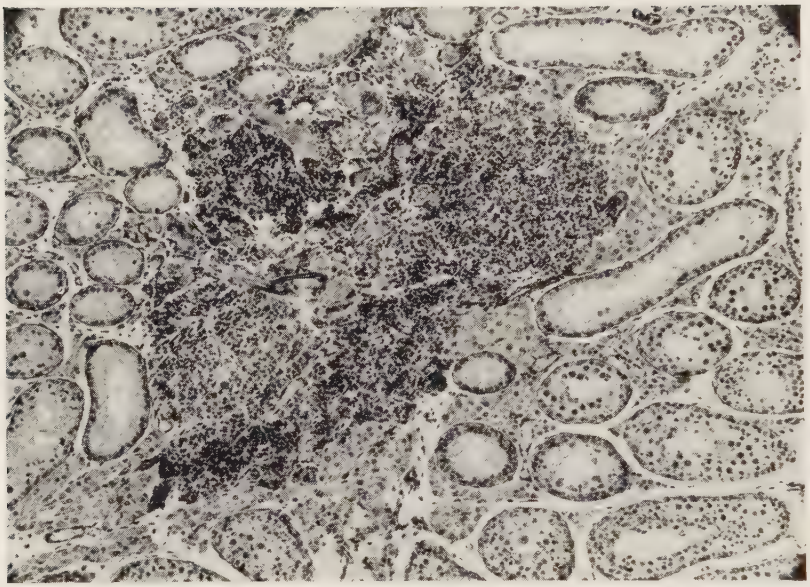
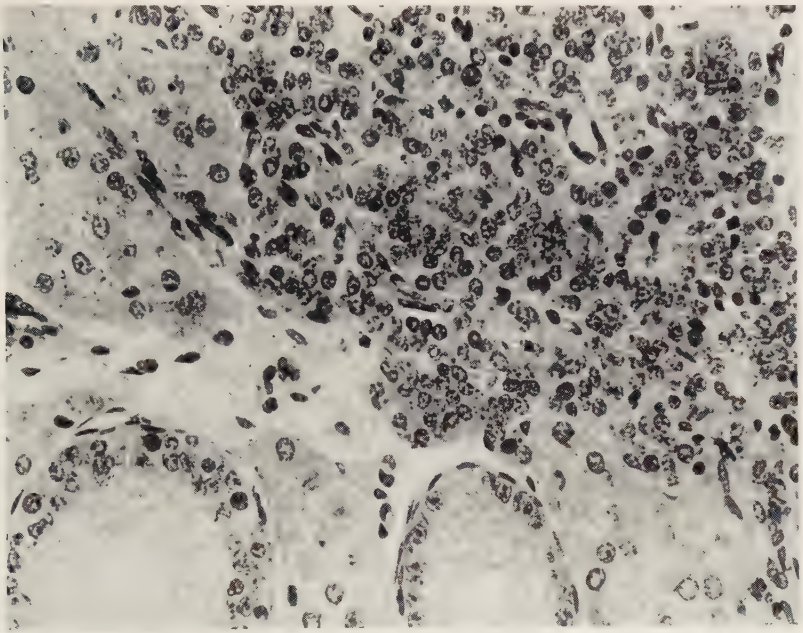
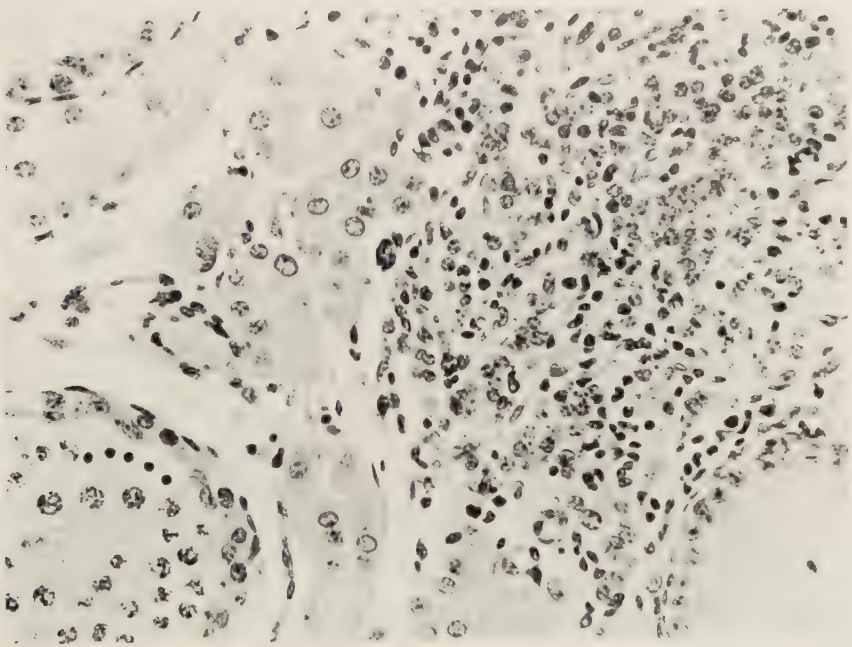


Fig. 17 - Homogreffe intratesticulaire d'un explant préhypophysaire de Cobaye adulte préalablement cultivé sur le milieu semi-synthétique pendant 1 mois. Testicule porte-greffon 3 semaines après l'inoculation. On distingue dans le greffon des cellules chromophobes et des cellules chromophiles. Glande interstitielle fortement hypertrophiée et hyperplasiée. Lignée séminale involuée. Gross. : × 130.

Fig. 18 - Même cas qu'en figure 17. Le cytoplasme des cellules interstitielles est finement vacuolaire. Gross. : × 320.

Fig. 19 - Homogreffe intratesticulaire d'un explant préhypophysaire de Cobaye adulte préalablement cultivé pendant 4 semaines sur le mélange « milieu semi-synthétique — extrait de cerveau fœtal ». Testicule porte-greffon 3 semaines après l'inoculation. Le greffon est constitué de cellules qui n'ont repris qu'en partie leurs caractères cytoplasmiques normaux. On voit une discrète infiltration lymphocytaire. Cellules interstitielles fortement hypertrophiées et hyperplasiées. Lignée séminale involuée. Gross. : × 320.





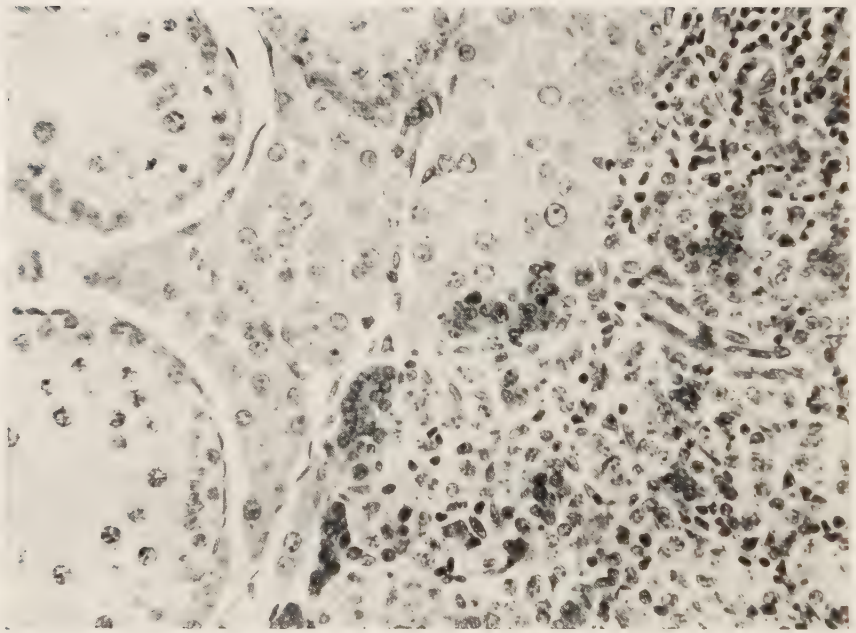
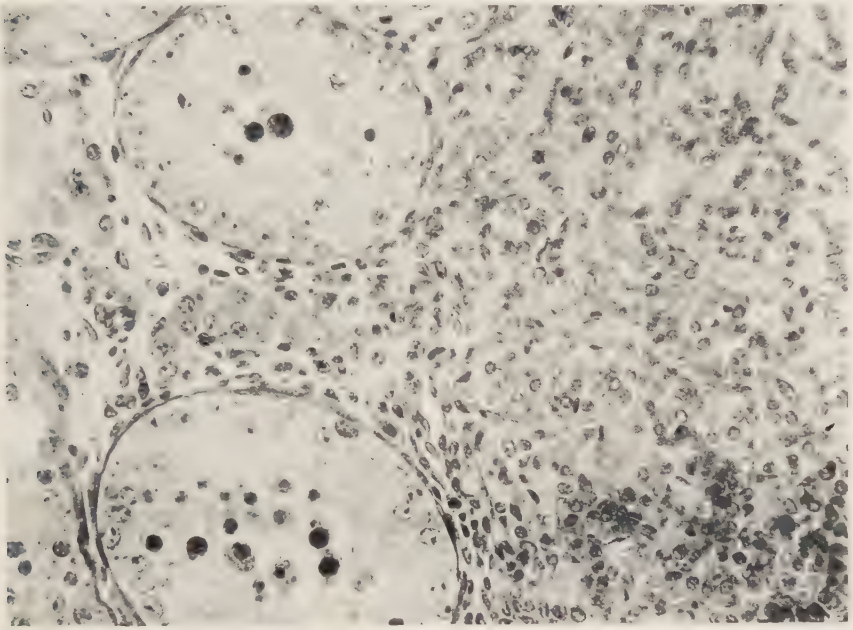
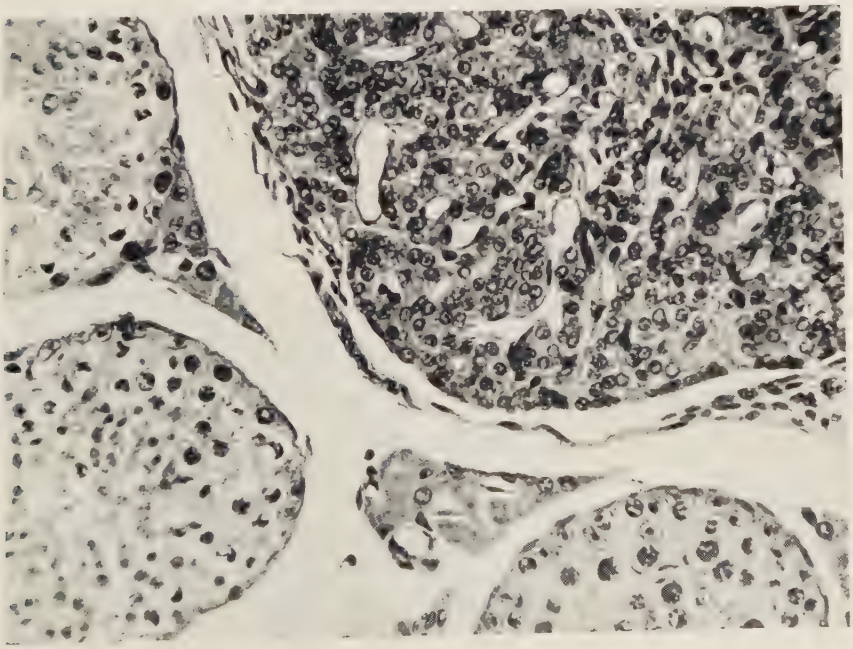


Fig. 20 - Homogreffe intratesticulaire d'un explant préhypophysaire de Cobaye adulte préalablement cultivé pendant 4 semaines sur le milieu semi-synthétique. L'animal porte-greffon est hypophysectomisé 6 semaines après l'inoculation, puis sacrifié 14 jours plus tard. La plupart des cellules du greffon préhypophysaire ont perdu leurs granulations chromophiles. La glande interstitielle apparaît hypertrophiée et hyperplasiée. La lignée séminale est involuée. Gross. : × 320.

Fig. 21 - Un explant préhypophysaire de Cobaye adulte préalablement cultivé pendant 4 semaines sur le milieu semi-synthétique est inoculé dans le testicule d'un Cobaye hypophysectomisé depuis 4 jours. L'animal porte-greffon est sacrifié 12 jours après l'inoculation. Les cellules du greffon préhypophysaire ont, toutes, un cytoplasme pratiquement chromophobe (dépourvu de granulations chromophiles), mais nettement pyroninophile (coloration d'Unna-Pappenheim). La glande interstitielle est légèrement hypertrophiée. Les tubes séminifères montrent des images de dégénérescence de l'épithélium séminal telles qu'on les voit après l'hypophysectomie totale. Gross. : · 320.

Fig. 22 - Hétérotransplantation d'un fragment de préhypophyse fraîchement prélevée chez un jeune Rat (80 g) dans le testicule de Cobaye. Testicule porte-greffon 18 jours après l'inoculation. Les cellules de l'implant sont en bon état de conservation, mais la chromophilie cytoplasmique est peu accusée. Les capillaires de l'implant montrent les premiers signes de dilatation. Les cellules interstitielles sont légèrement hypertrophiées. L'épithélium séminal est partiellement involué. Gross. : 320.





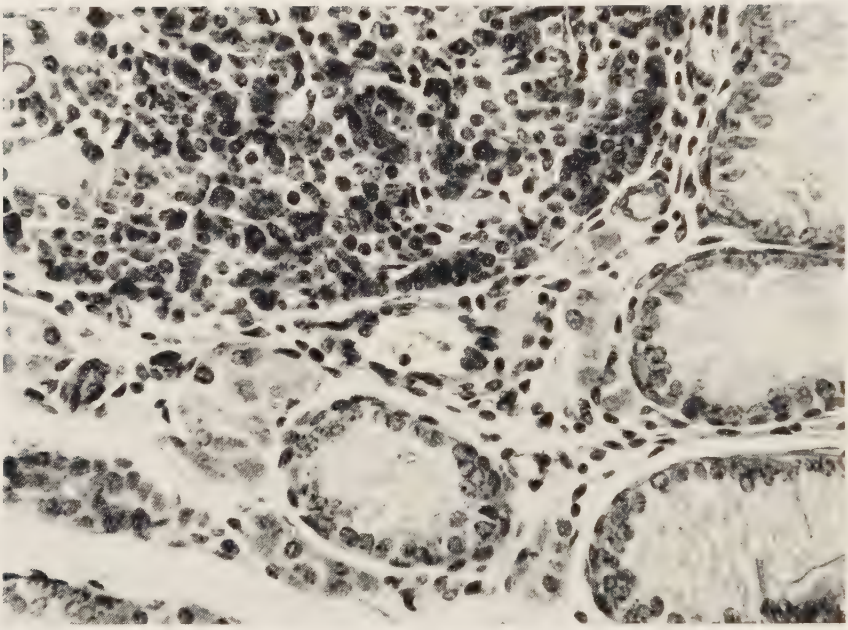
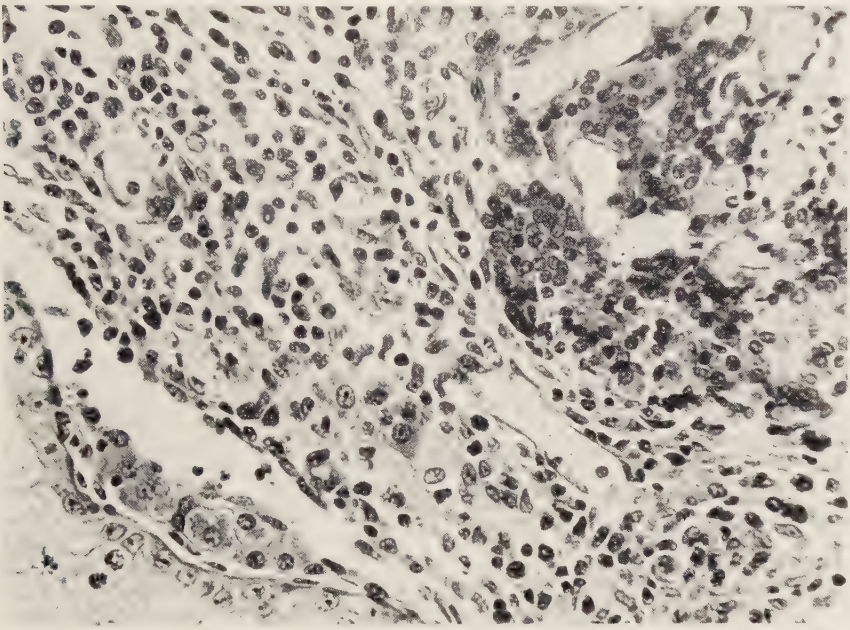
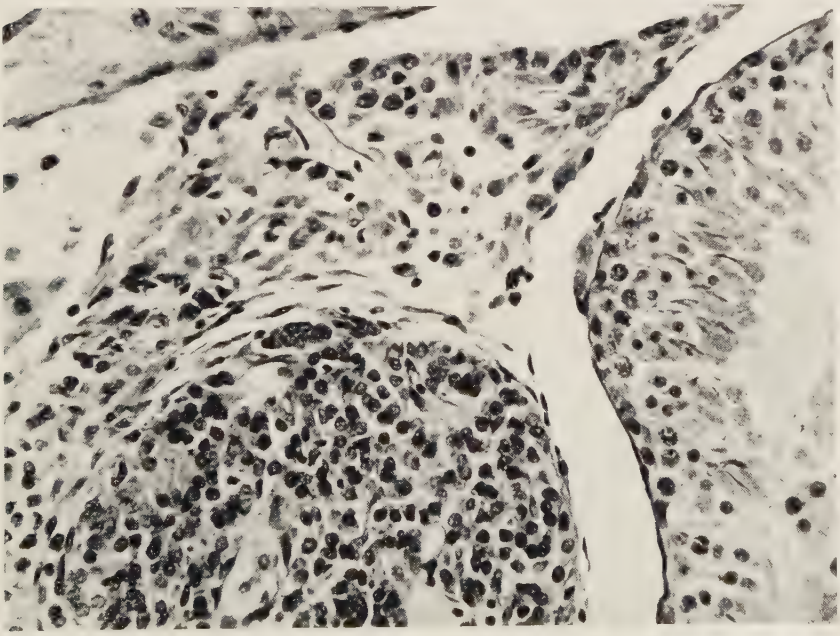


Fig. 23- Hétérotransplantation d'un explant préhypophysaire de jeune Rat (80 g) préalablement cultivé pendant 4 semaines sur le milieu semi-synthétique, dans le testicule de Cobaye. Testicule porte-greffon 18 jours après l'inoculation. On distingue dans l'implant des cellules chromophiles et des cellules chromophobes. Début de dilatation capillaire. Les cellules interstitielles sont nettement hypertrophiées. Les tubes séminifères sont involués. Gross. : × 320.

Fig. 24 - Hétérotransplantation d'un explant préhypophysaire de fœtus humain de 7 mois préalablement cultivé pendant 4 semaines sur le milieu semi-synthétique, dans le testicule de Cobaye. Testicule porte-greffon 25 jours après l'inoculation. Forte dilatation capillaire et début de l'infiltration lympho-plasmocytaire de l'implant. Implant constitué de cellules chromophiles et chromophobes. Cellules interstitielles hypertrophiées. Lignée séminale involuée. Gross. : · 320.

Fig. 25 - Homogreffe intratesticulaire d'un explant préhypophysaire de Rat adulte préalablement cultivé pendant 4 semaines sur le milieu semi-synthétique. Testicule porte-greffon 1 mois après l'inoculation. Le greffon est formé de cellules à cytoplasme chromophile. La glande interstitielle est hypertrophiée et hyperplasiée. Les tubes séminifères sont normaux. Gross. : × 320.





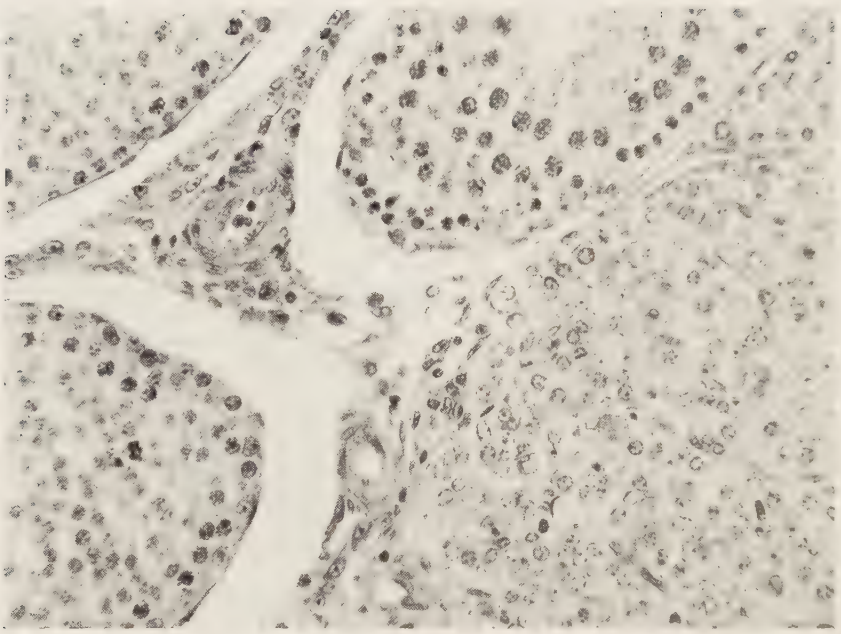
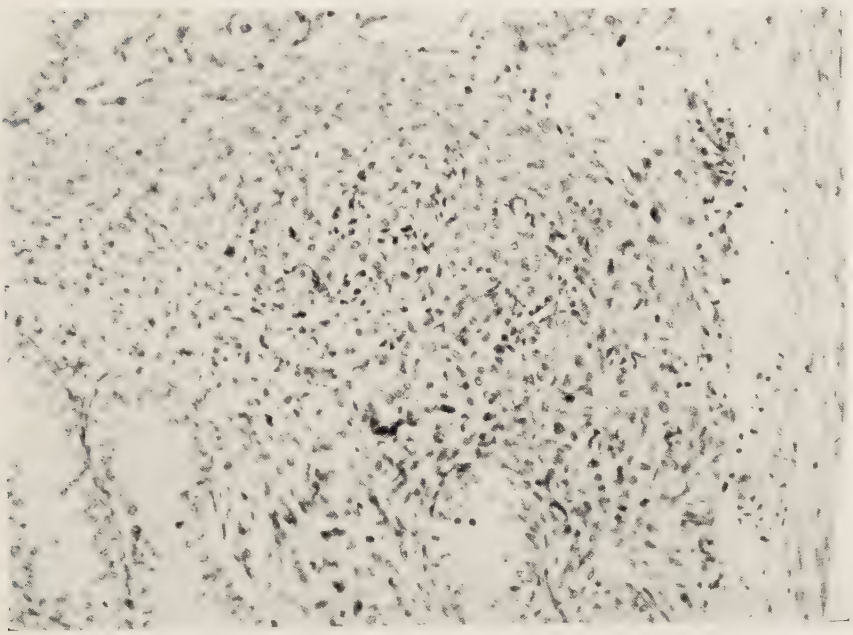
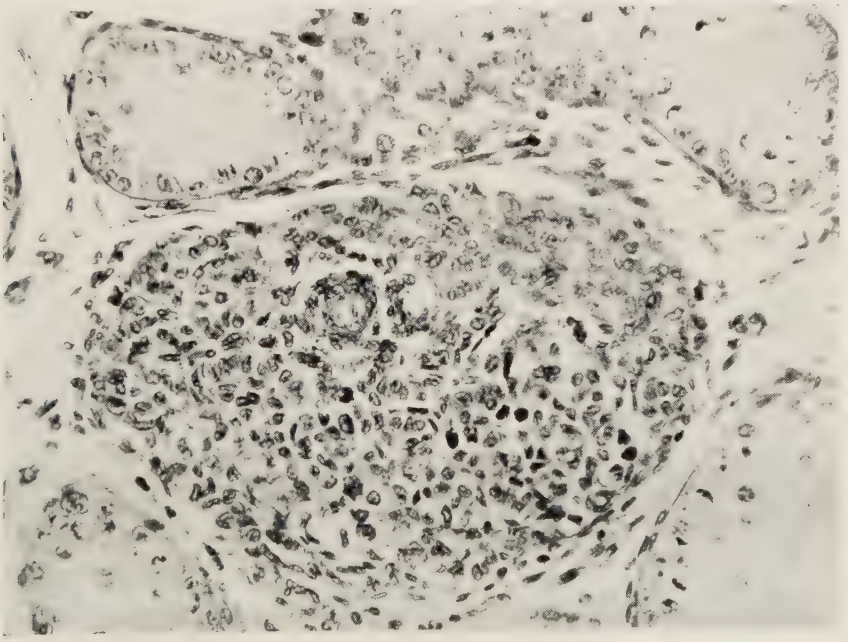


Fig. 26 - Hétérotransplantation d'un explant préhypophysaire de jeune Cobaye (140 g) préalablement cultivé pendant 4 semaines sur le milieu semi-synthétique, dans le testicule de Rat prématuré. Testicule porte-greffon 16 jours après l'inoculation. Implant formé de cellules chromophiles et chromophobes. Cellules interstitielles légèrement hypertrophiées. Gross. : × 320.

Fig. 27 - Homogreffe intratesticulaire d'un fragment de cortex surrénalien fraîchement prélevé chez un Cobaye adulte. Testicule porte-greffon 10 semaines après l'inoculation. Le greffon montre les cellules de la zone sous-capsulaire, fortement épaissie, et celles de la zone glomérulaire. Gross. : × 170.

Fig. 28 - Homogreffe intratesticulaire d'un explant corticosurrénalien de Cobaye préalablement cultivé pendant 3 semaines. Testicule porte-greffon 6 semaines après l'inoculation. Le greffon, encore bien arrondi, montre les cellules de la zone sous-capsulaire, épaissie, et les cellules de la zone glomérulaire. Gros. : × 320.





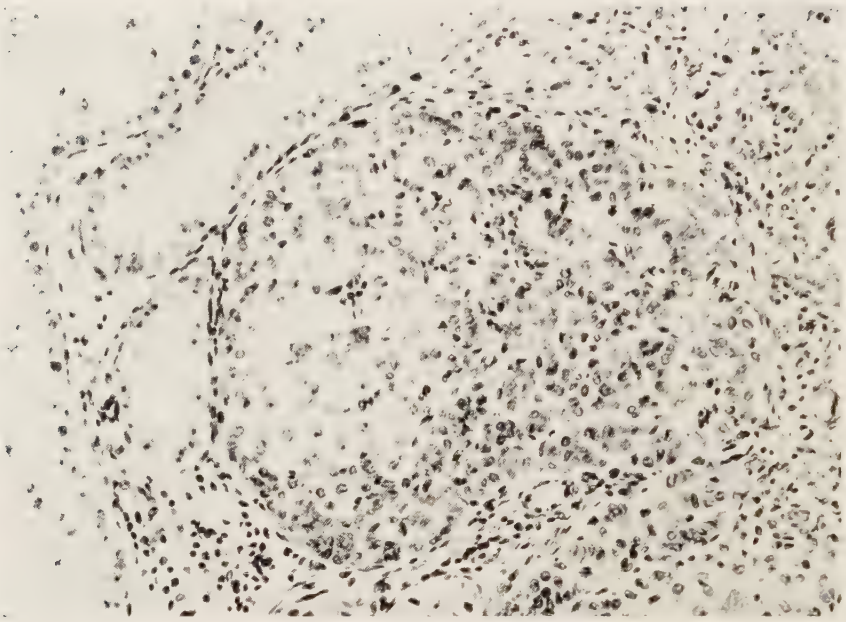
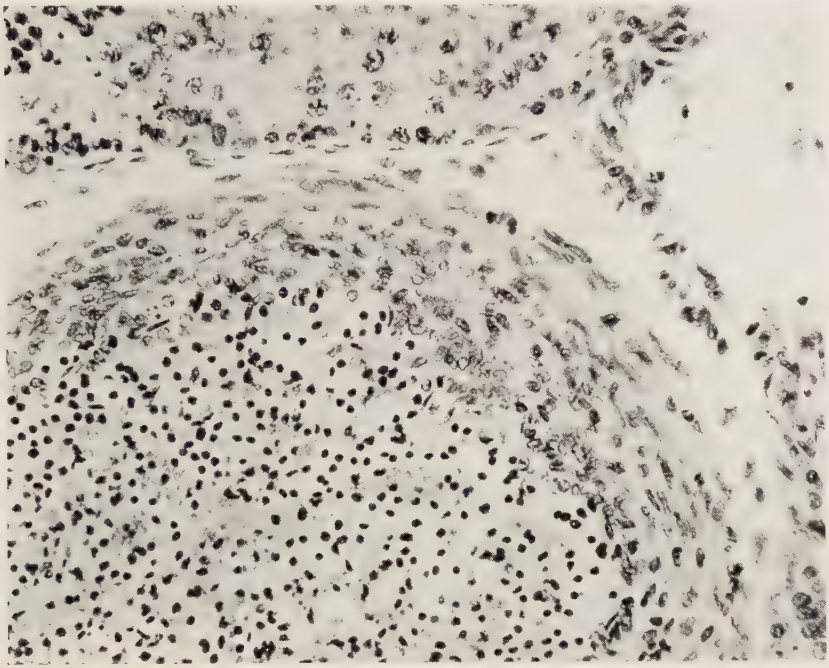
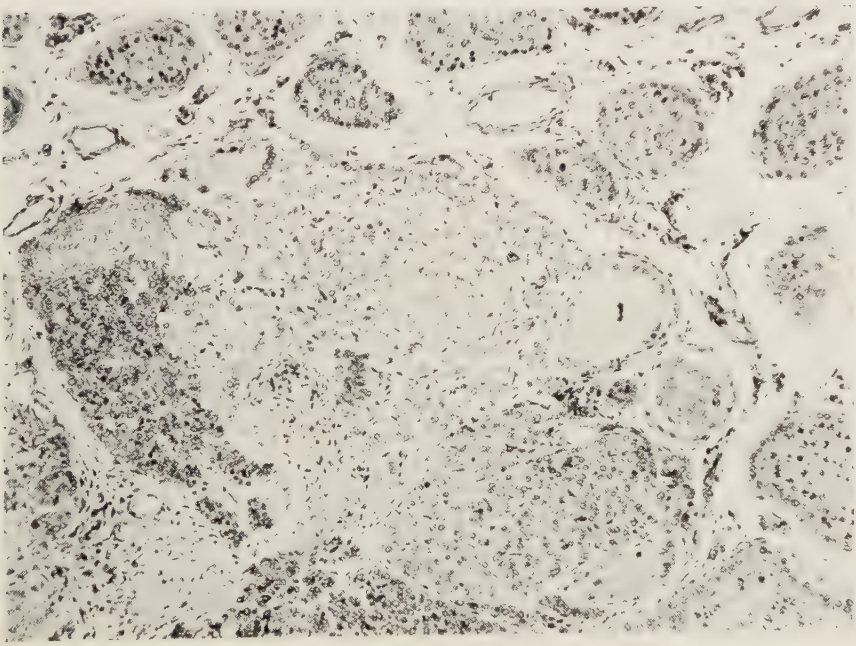


Fig. 29 - Homogreffe intratesticulaire d'un explant corticosurrénalien de fœtus de Cobaye de 6 cm préalablement cultivé pendant 10 jours. Testicule porte-greffon 10 semaines après l'inoculation. On reconnaît dans le greffon des cellules glomérulaires et des spongiocytes, cytologiquement différenciés, mais non disposés en faisceaux. Gross.: × 240.

Fig. 30 - Homogreffe intratesticulaire d'un explant cortico-surrénalien de Hamster ordinaire nouveau-né, préalablement cultivé pendant deux semaine. L'animal porte-greffon est surrénalectomisé quelques semaines plus tard et sacritié 6 mois après l'inoculation (au mois de novembre). Testicule porte-greffon. L'implant est formé d'une couronne de cellules de la zone sous-capsulaire et, au centre, de spongiocytes involués. Gross. : × 320.

Fig. 31 - Homogreffe intratesticulaire chez le Hamster de l'ensemble « préhypophyse-corticosurrénale » cultivé préalablement durant 5 jours. L'animal porte-greffons est surrénalectomisé quelques semaines plus tard et sacrifié 6 mois après l'inoculation (fin novembre). On reconnaît les greffons préhypophysaire et cortico-surrénalien (voir page 217) Gross. : × 120.





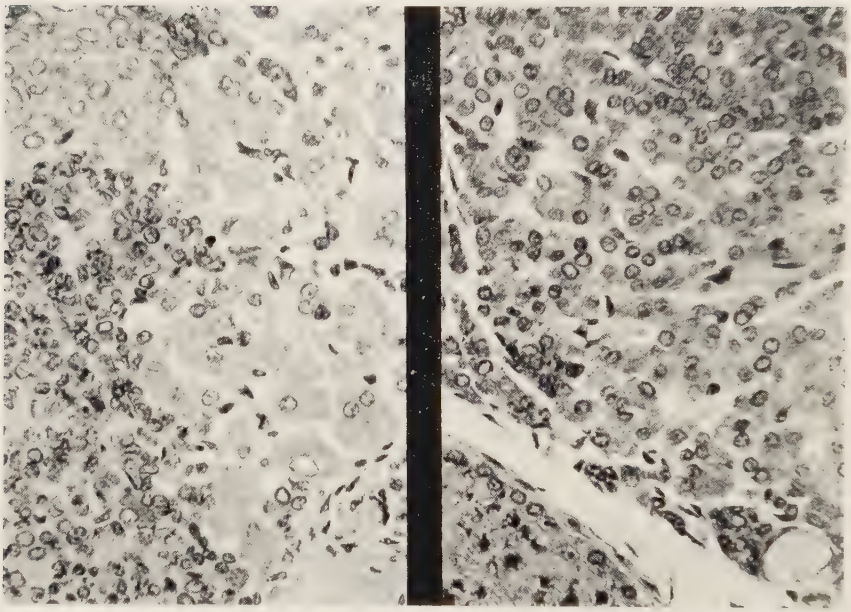
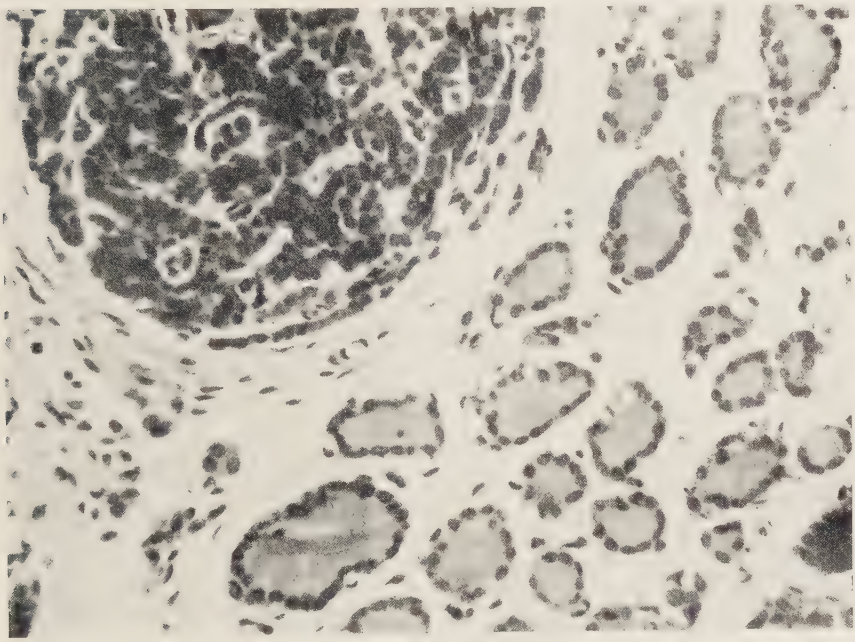
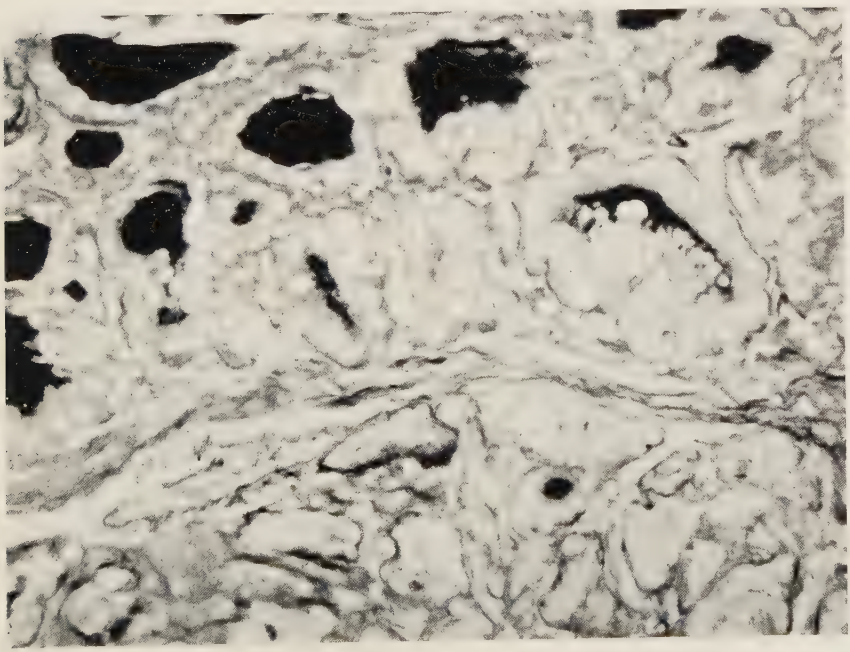


Fig. 32 - Même animal qu'en figure 31. *A gauche :* même image que figure 31, à un plus fort grossissement. Cellules corticosurrénaliennes au voisinage du greffon préhypophysaire fortement hypertrophiées et finement vacuolisées. *A droite :* fragment corticosurrénalien cultivé seul et greffé dans le testicule controlatéral, à titre de témoin. Gross. : × 320.

Fig. 33 - Homogreffe intrathyroïdienne d'un explant préhypophysaire de Cobaye adulte préalablement cultivé pendant 4 semaines sur le milieu sémi-synthétique. Le fragment a été prélevé dans la région postéro-latérale de la *pars distalis*. Thyroïde porte-greffon 8 semaines après l'inoculation. Le greffon préhypophysaire est formé exclusivement de cellules acidophiles. Les vésicules thyroïdiennes sont en état de repos fonctionnel. Gross. : 250.

Fig. 34 - Homogreffe intrathyroïdienne d'un explant préhypophysaire de Cobaye adulte préalablement cultivé *in vitro* sur le milieu semi-synthétique pendant 4 semaines. Le fragment a été prélevé dans la région antérieure de la *pars distalis*. Thyroïde porte-greffon 10 semaines après l'inoculation. Coloration à la fuchsine-paraldéhyde de Gomori. Absence, dans le greffon préhypophysaire, de cellules à cytoplasme riche en granulations fuchsine-paraldéhyde positives. Forte activité sécréto-excrétrice des vésicules thyroïdiennes. Gross.: × 520.





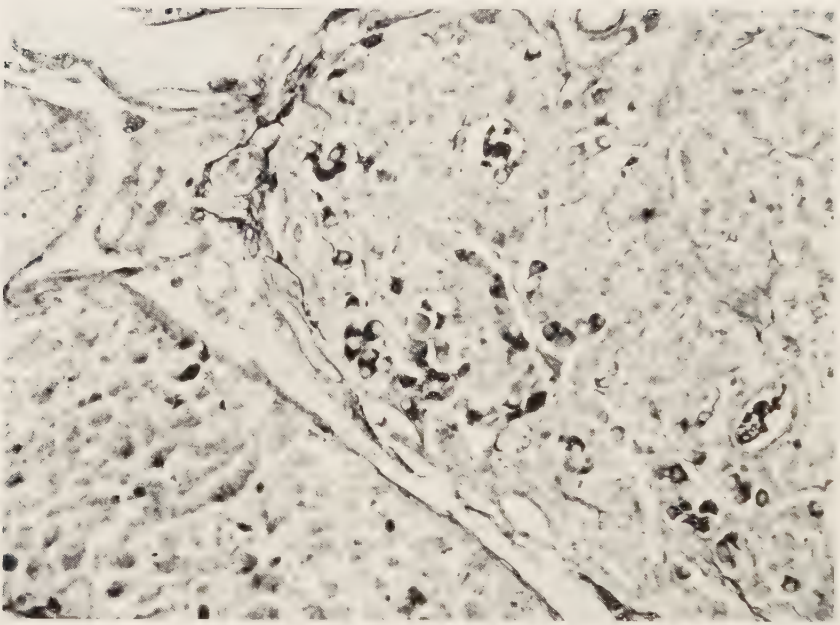


Fig. 35 - Homogreffe intratesticulaire d'un explant préhypophysaire de Cobaye adulte préalablement cultivé *in vitro* sur le milieu semi-synthétique pendant 4 semaines. Le fragment a été prélevé dans la région antérieure de la *pars distalis*. Testicule porte-greffon dix semaines après inoculation. Coloration à la fuchsine-paraldéhyde de Gomori. Le greffon préhypophysaire renferme de nombreuses cellules à cytoplasme bourré de granulations spécifiques. Gross. : × 320.

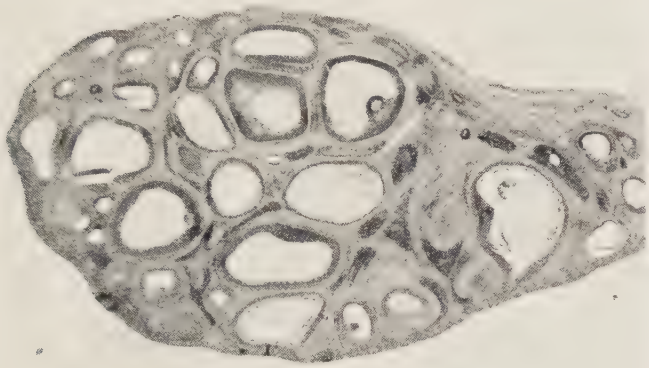


Fig. 36 - Même animal qu'en figure 37. Ovaire non-inoculé d'un Cobaye dont la gonade controlatérale est inoculée. Images de croissance folliculaire. Gross. : 35.

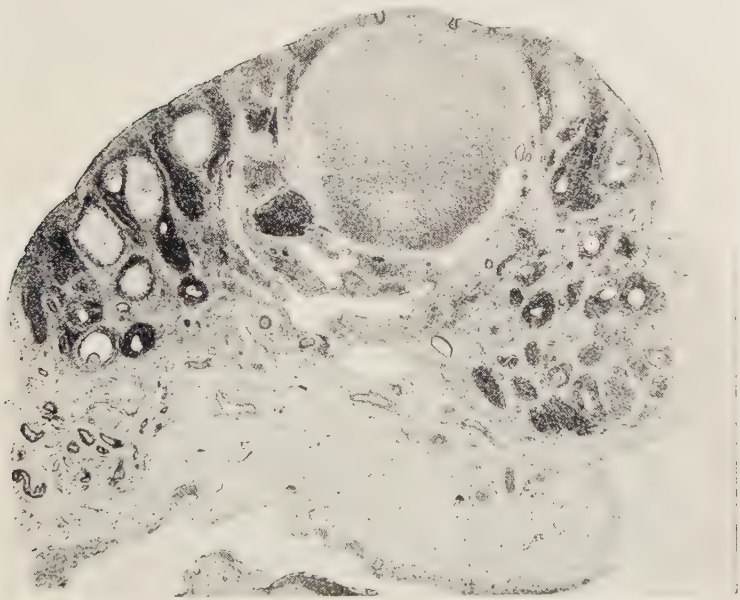


Fig. 37 - Homogreffe intraovarienne d'un explant préhypophysaire de Cobaye adulte préalablement cultivé pendant 22 jours sur le milieu semi-synthétique. Ovaire porte-greffon 6 jours après l'inoculation. Tous les follicules ovariens, frappés d'atrésie, se tranforment en nodules thécaux. Un corps jaune à côté du greffon. Gross. : × 35.

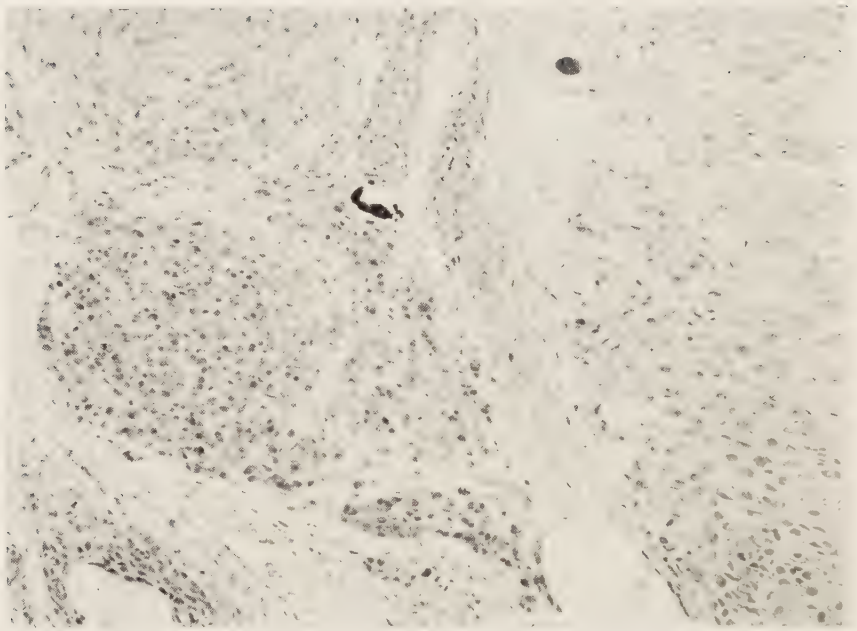


Fig. 38 - Même cas qu'en figure 37. Le greffon renferme déjà des cellules chromophiles. On reconnaît une légère hypertrophie des cellules d'un ancien nodule thécal situé entre le greffon et le corps jaune Gross. : × 160.

Fig. 40 - Même animal qu'en figure 39. Ovaire controlatéral non inoculé. Images de croissance folliculaire. Gross. : × 50.

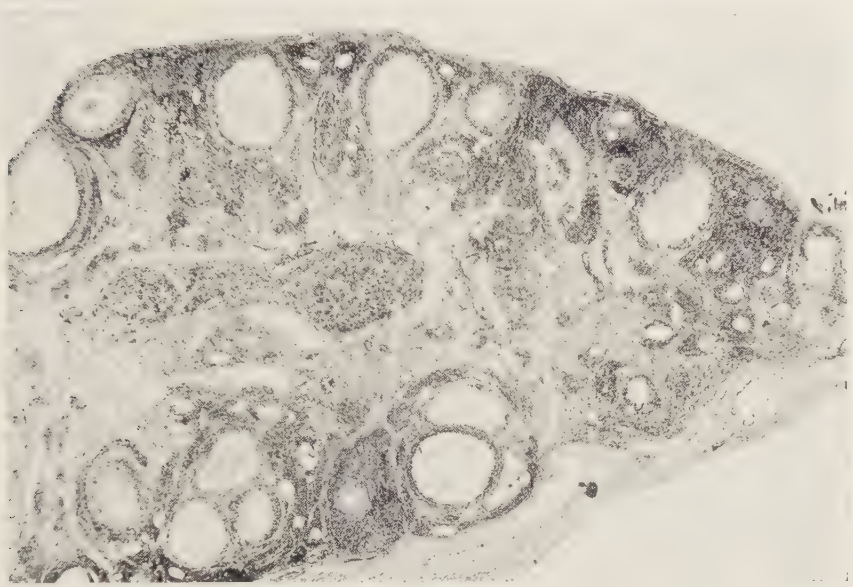
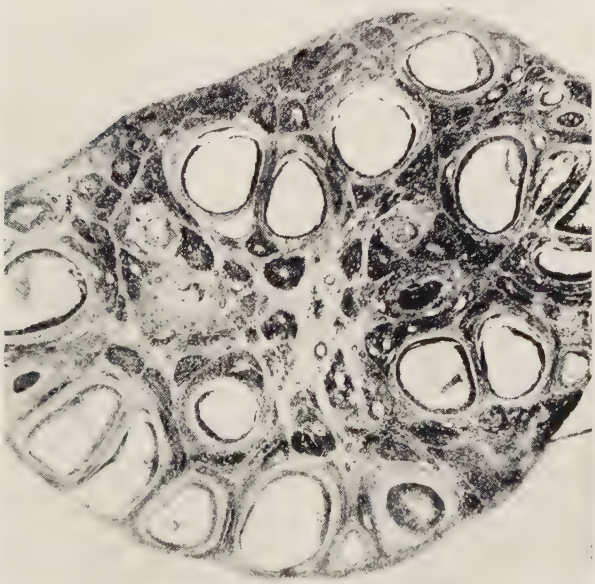


Fig. 39 - Homogreffe intraovarienne d'un explant préhypophysaire de Cobaye adulte préalablement cultivé pendant 26 jours sur le milieu semi-synthétique. Ovaire porte-greffon 27 jours après l'inoculation. Tous les follicules sont frappés d'atrésie dès qu'ils atteignent une certaine taille. Gross. : × 50.



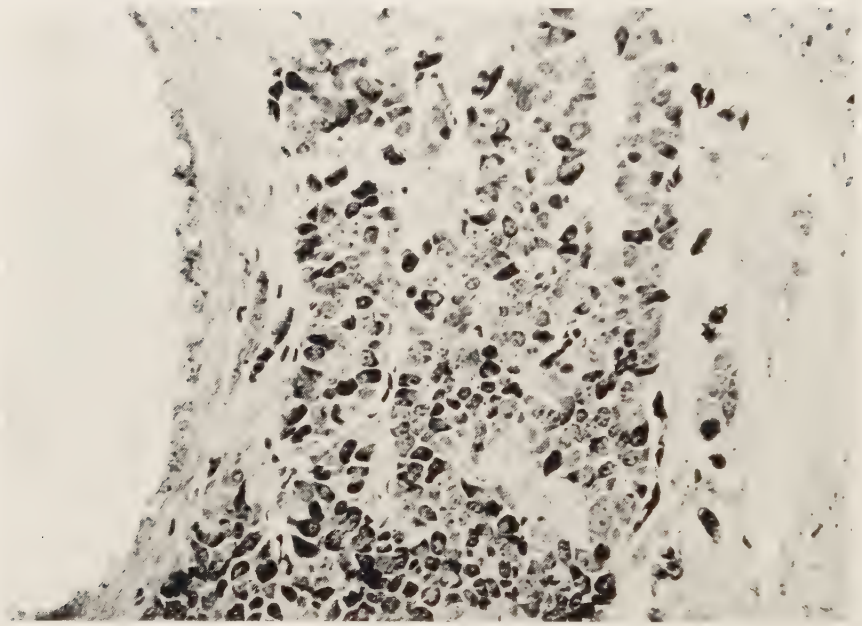


Fig. 41 - Homogreffe intraovarienne d'un explant préhypophysaire de Cobaye adulte préalablement cultivé pendant 3 semaines sur le milieu semi-synthétique. Ovaire porte-greffon 3 mois après l'inoculation. Le greffon est formé de cellules chromophiles et chromophobes. Gross. : ⁄ 320.

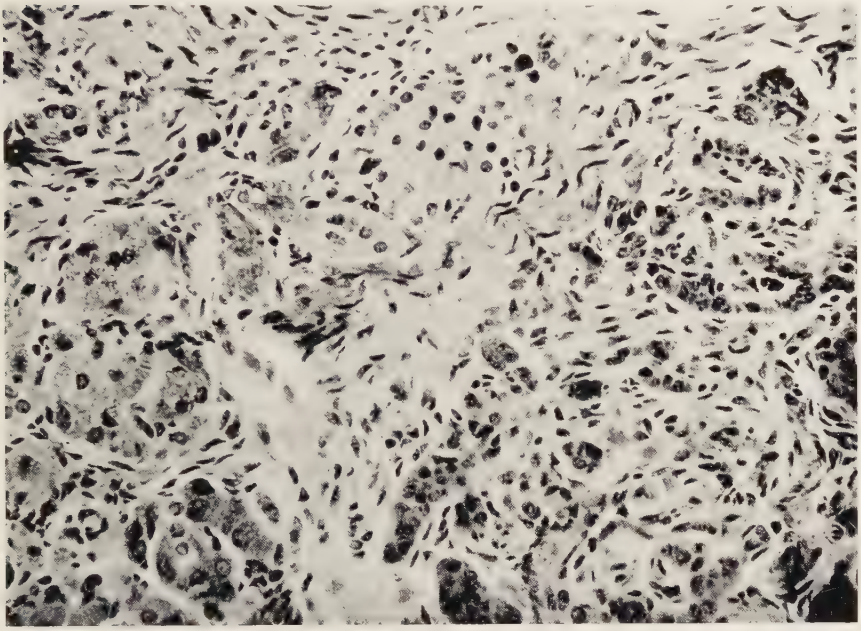


Fig. 42 - Même ovaire qu'en figure 41. *A droite :* partie périphérique du greffon préhypophysaire. *A gauche :* forte hypertrophie de cellules constitutives d'anciens nodules thécaux. Gross. : × 280.

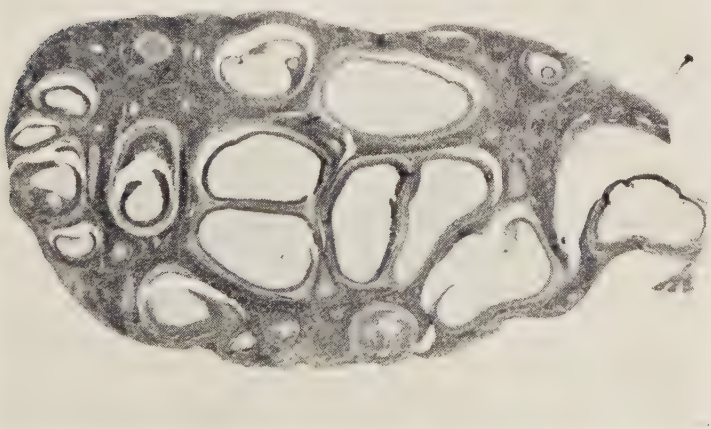


Fig. 43 - Même cas qu'en figure 41. Ovaire controlatéral non-inoculé. Images de croissance folliculaire. Gross. : × 35.

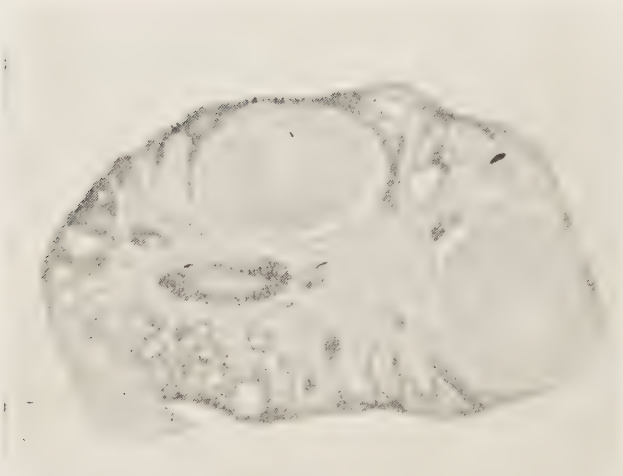


Fig. 44 - Homogreffe d'un explant préhypophysaire de Cobaye adulte préalablement cultivé pendant 4 semaines sur le milieu semi-synthétique, dans l'ovaire d'un Cobaye qui vient d'être hypophysectomisé. Ovaire porte-greffon 12 jours après l'hypophysectomie. On reconnaît le greffon et deux corps jaunes expérimentaux. Les autres follicules ont été atrésiés. Gross. : × 25.

Fig. 45 - Même cas qu'en figure 44. Ovaire controlatéral non-inoculé. Atrésie généralisée. Quelques follicules secondaires en croissance lente : cellules folliculeuses à noyau petit et dense et à cytoplasme peu abondant; mitoses exceptionnelles. Gross. : × 25.

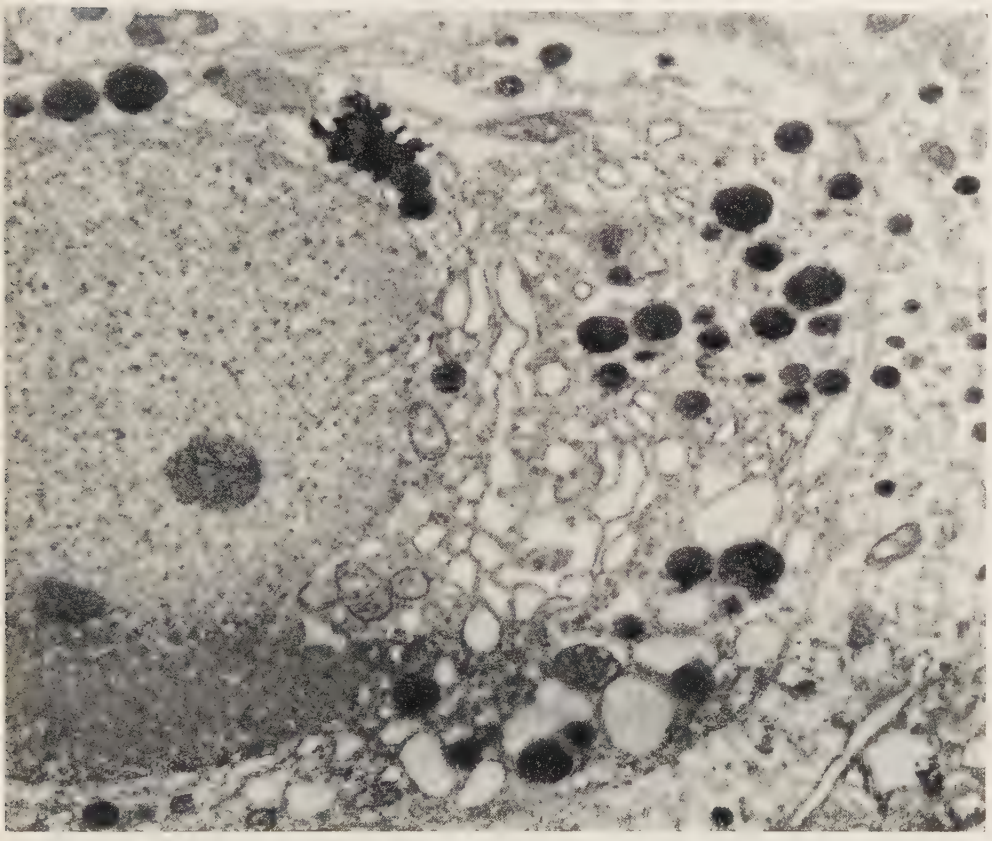


Fig. 46 - Explant préhypophysaire provenant de la zone moyenne de la *pars distalis* de Cobaye adulte, cultivé pendant 25 jours sur le milieu semi-synthétique. Le cytoplasme abondant, la zone golgienne bien développée, l'ergastoplasme lamellaire et vésiculaire et la présence de quelques grosses granulations spécifiques, sont les caractères d'une cellule ε.

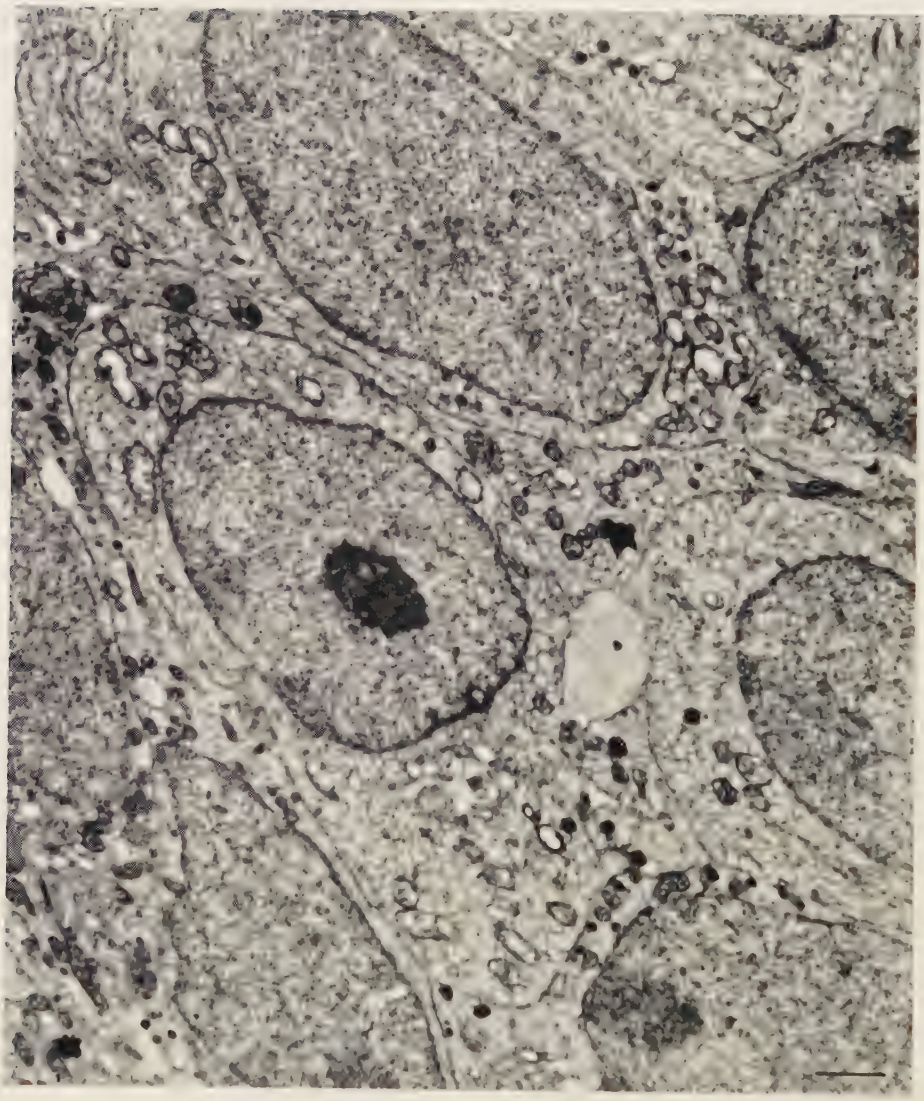


Fig. 47 - Explant préhypophysaire provenant de la zone antérieure de la *pars distalis* de Cobaye adulte, cultivé pendant 25 jours sur le milieu semi-synthétique. Rapports cellulaires normaux conservés. Cytoplasme pratiquement dépourvu de granulations sécrétoires. Abondance de vésicules ergastoplasmiques à contenu faiblement osmiophile, caractéristique de la variété cellulaire β.

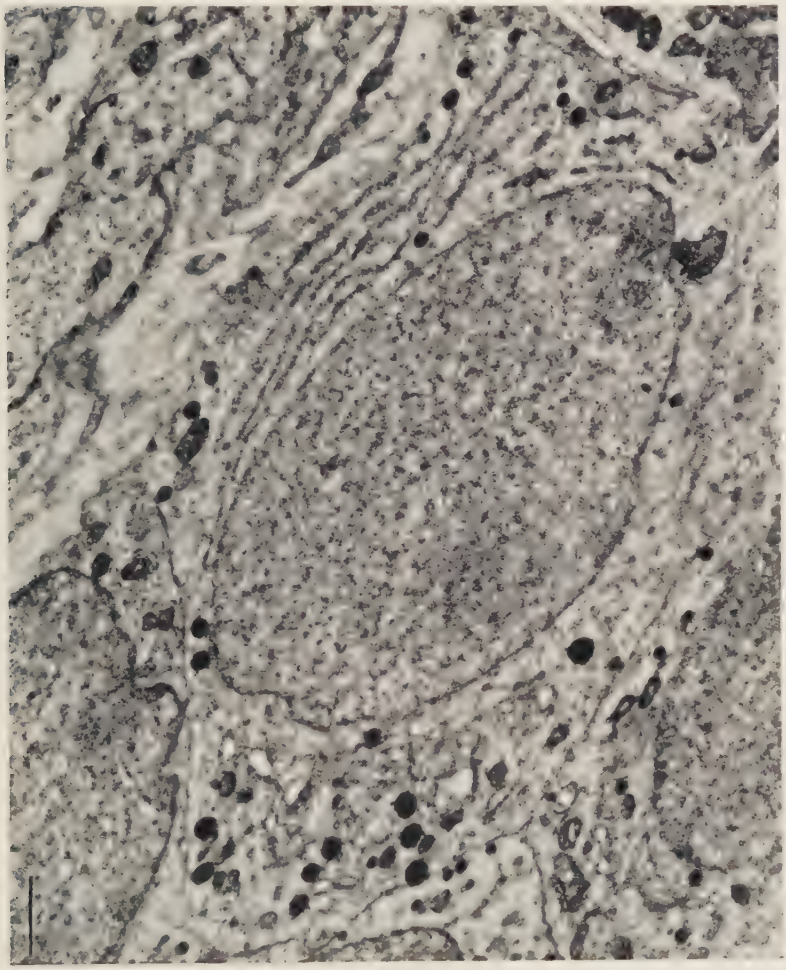


Fig. 48 - Explant préhypophysaire provenant de la zone postéro-latérale de la *pars distalis*, cultivé pendant 25 jours sur le milieu semi-synthétique. Absence quasi-totale de granulations sécrétoires. L'appareil de Golgi bien développé, la richesse du cytoplasme en fines vésicules, la présence de citernes ergastoplasmiques allongées et parallèles dans la zone paranucléaire sont des caractères de la variété α.

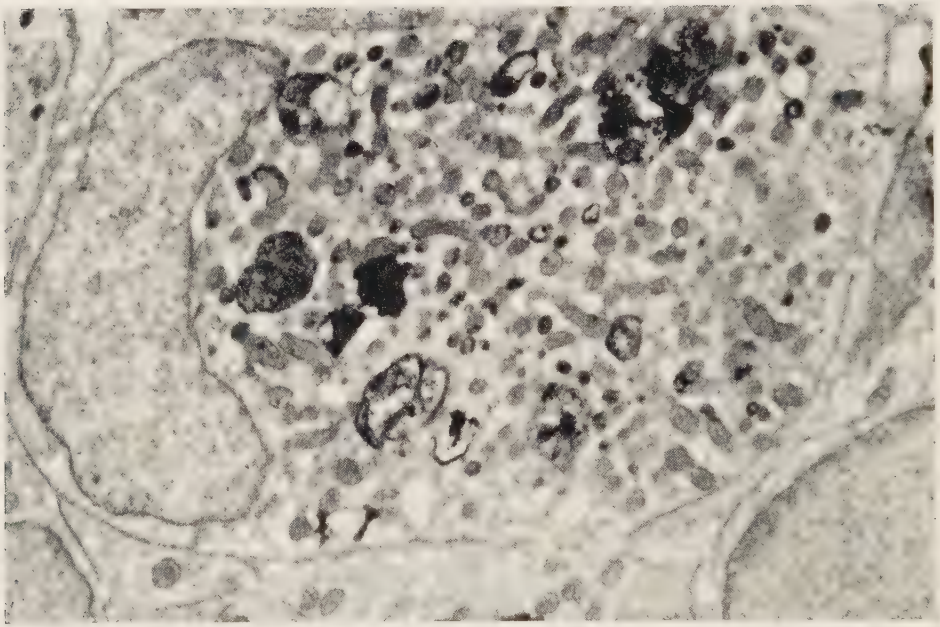


Fig. 49 - Explant préhypophysaire provenant de la zone antérieure de la *pars distalis* de Cobaye adulte, cultivé pendant 25 jours. Cellule de type mucoprotidique; son cytoplasme évoque certains aspect évolutifs des cellules δ.

Fig. 50bis - Explant préhypophysaire cultivé sur milieu à base d'extrait d'embryon de Poulet de 7 jours d'incubation, pendant 24 heures. Divers types de cellules préhypophysaires. *En bas :* cellules γ et ε. *Au milieu :* cellule δ. *En haut :* cellule α.

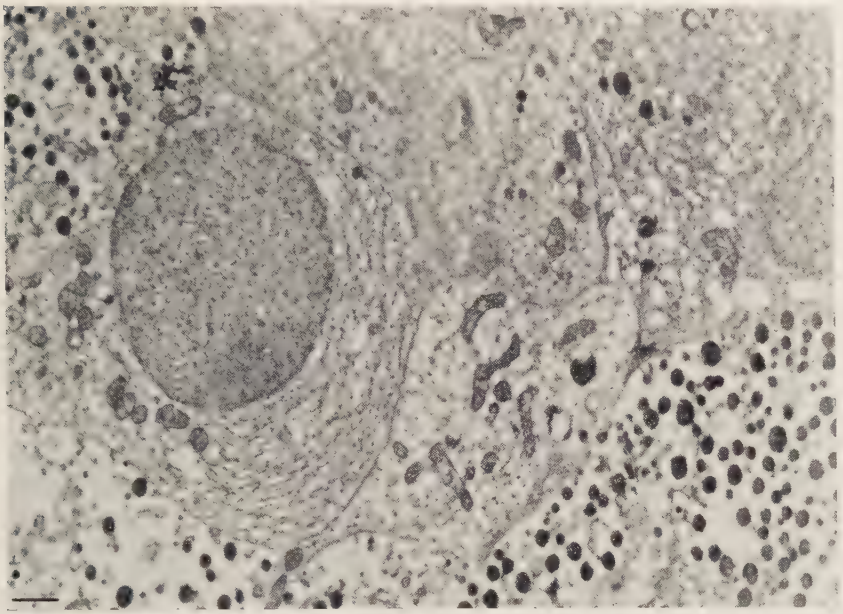
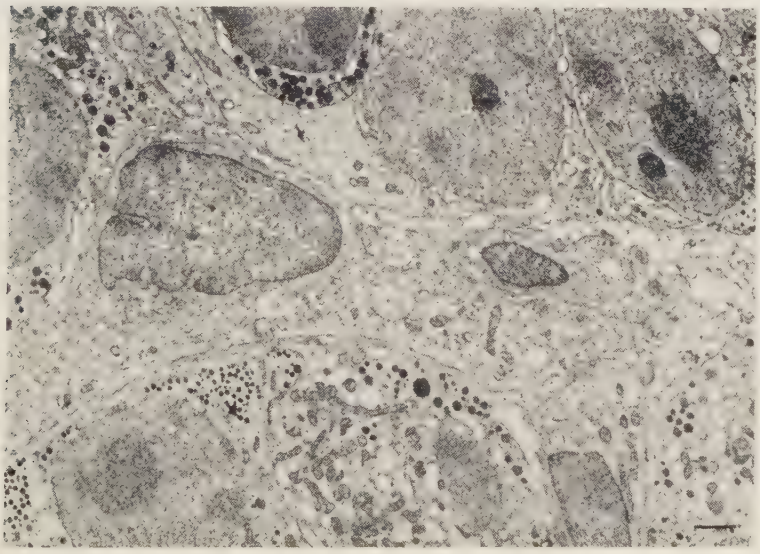


Fig. 50 - Explant préhypophysaire cultivé sur le milieu anhormonal. Persistance de granulations sécrétoires dans les cellules dégénérées. Désorganisation et involution de l'ergastoplasme dans les cellules moins atteintes.



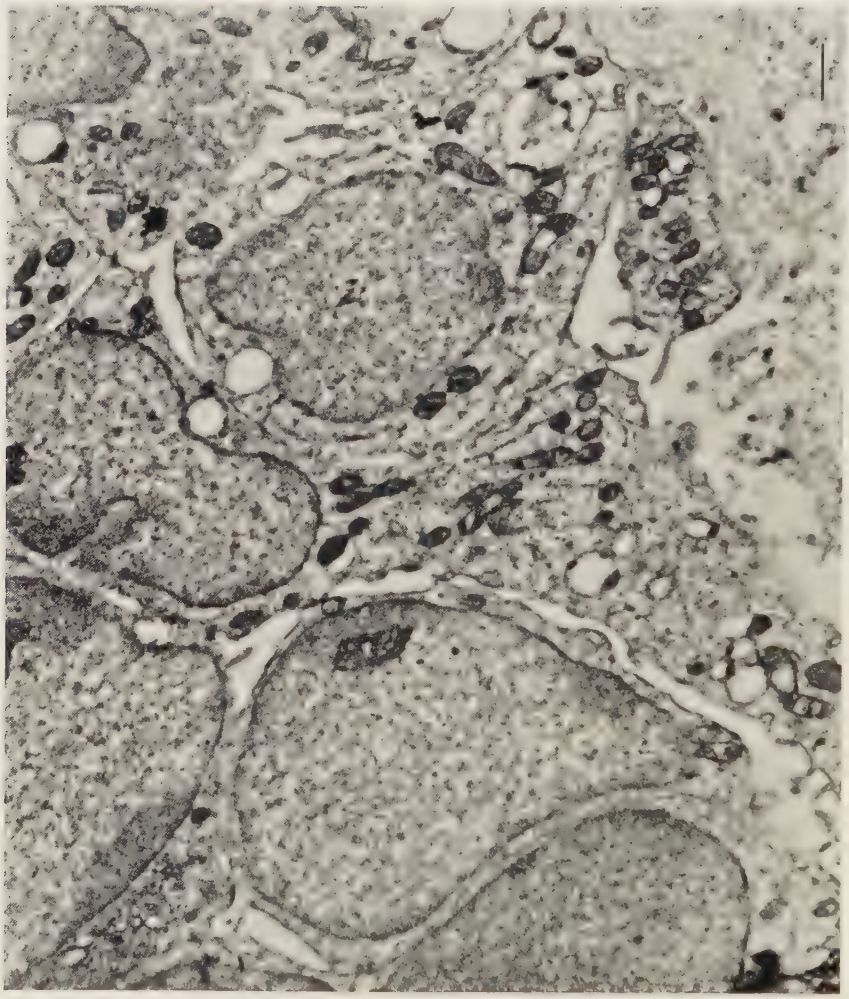


Fig. 51 - Explant préhypophysaire de Cobaye adulte cultivé pendant 21 jours sur le milieu semi-synthétique, additionné d'un extrait de cerveau d'embryon de Poulet de 12 jours d'incubation. Cellules en voie de séparation. Persistance de quelques points d'attache.

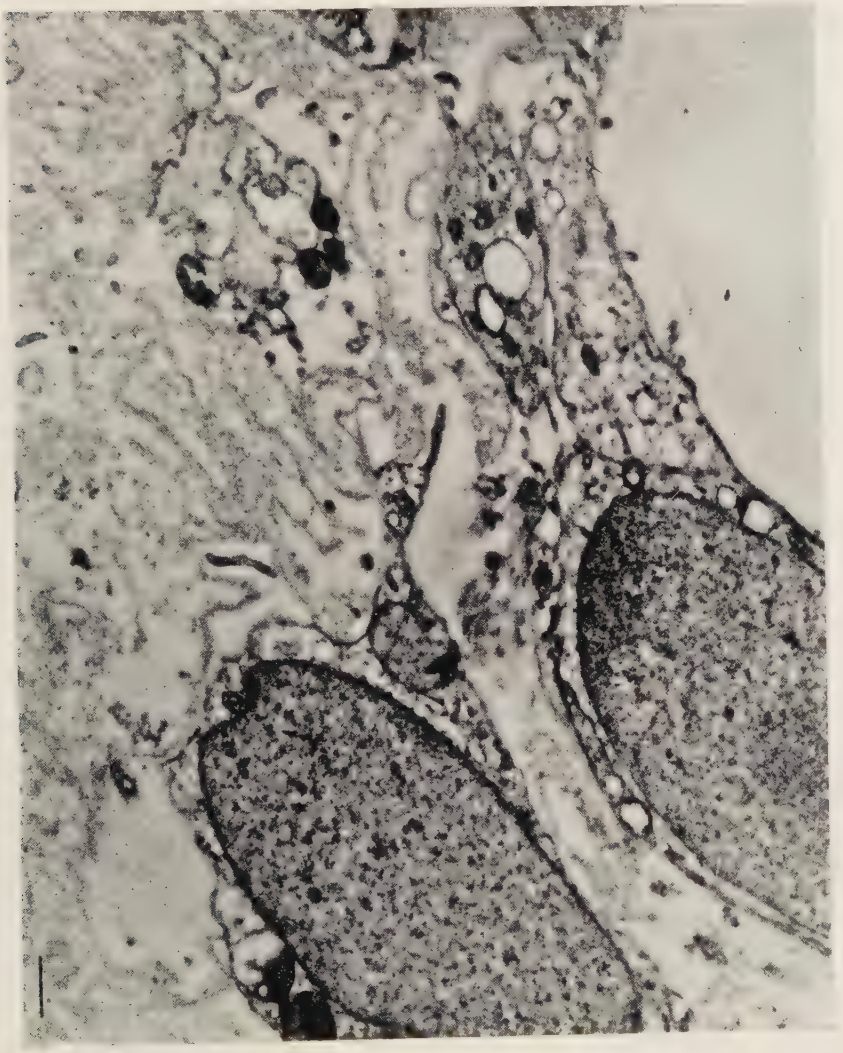


Fig. 52 - Explant préhypophysaire de Cobaye adulte, cultivé pendant 21 jours sur milieu semi-synthétique, additionné d'un extrait de cerveau fœtal. Aspects déterminés par les mouvements cellulaires. *A droite :* Cellules préhypophysaires limitant une cavité néoformée. *A gauche et en bas :* Cellule en migration; replis sinueux des membranes basales formant des sacs déshabités.

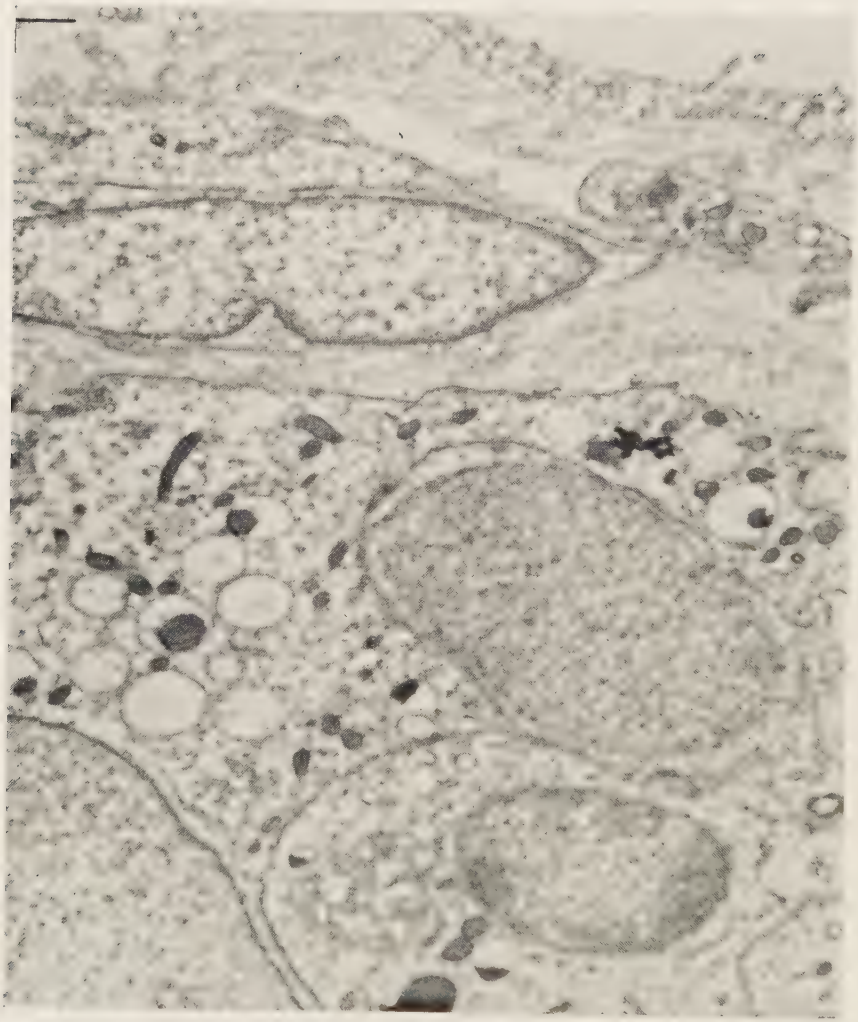


Fig. 53 - Explant préhypophysaire de Cobaye adulte cultivé pendant 21 jours sur milieu semi-synthétique additionné d'un extrait de cerveau fœtal. Aspects particuliers de dégénérescence mitochondriale.

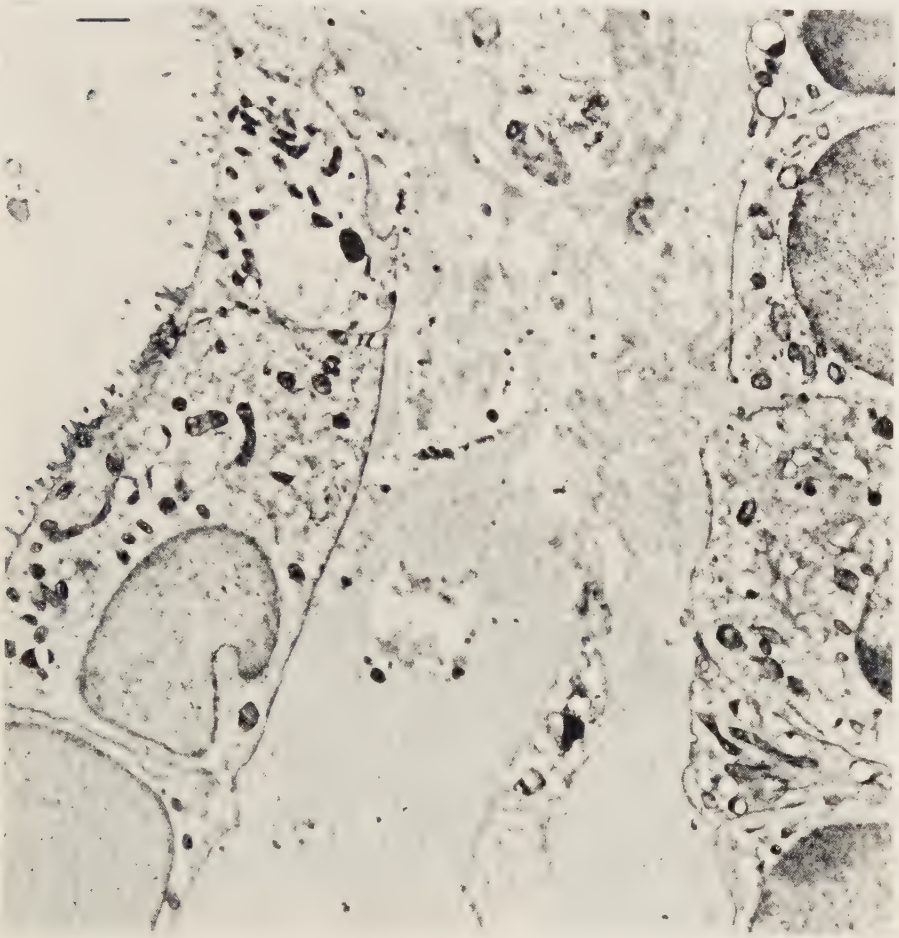


Fig. 54 - Même explant que figure 53. Divers aspects de dégénérescence mitochondriale, de migration cellulaire, de formation de cavités, de dessins compliqués des basales.

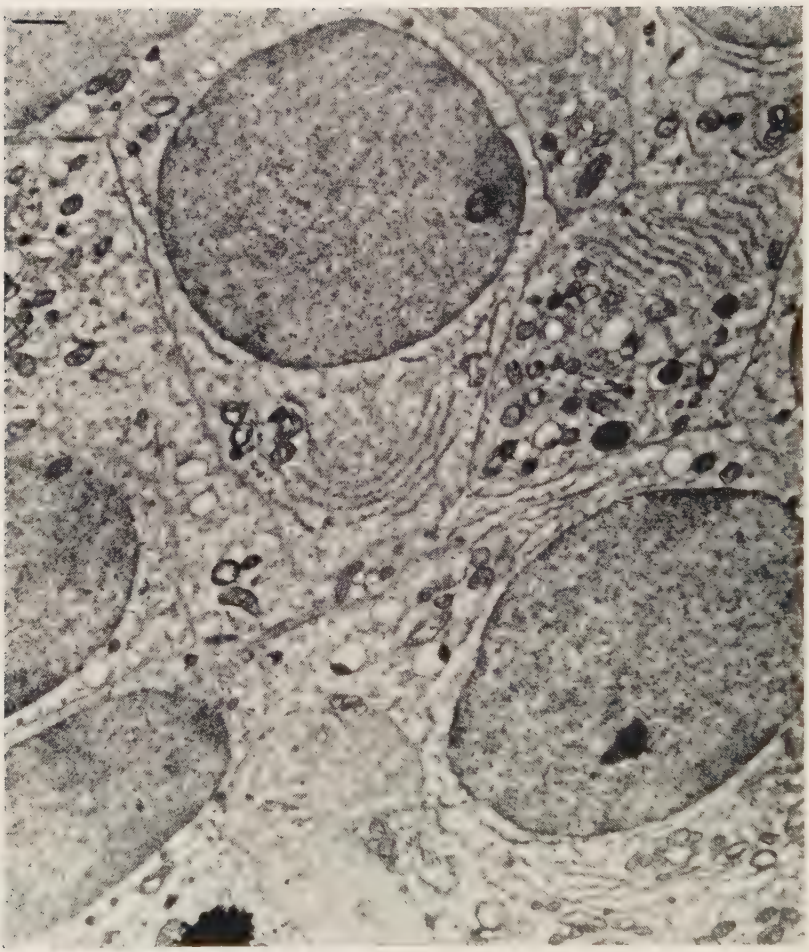


Fig. 55 - Même explant que figure 53. Plage de cellules montrant comme seule altération une dégénérescence partielle du chondriome. Seules les cellules ε sont reconnaissables.

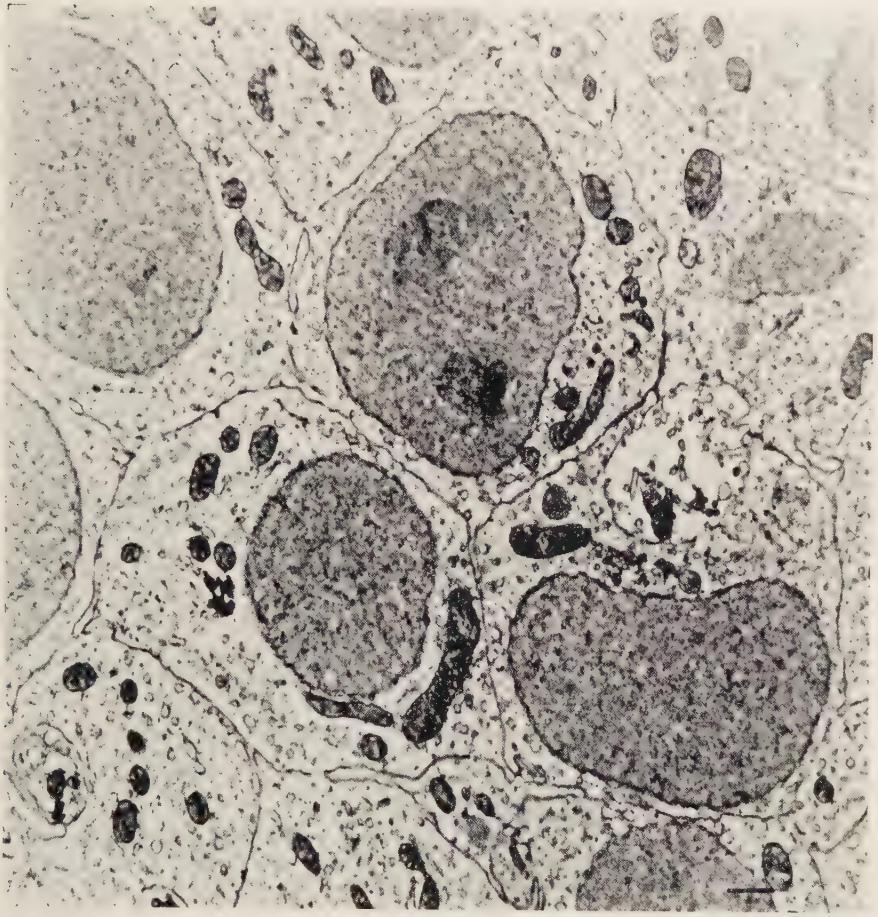


Fig. 56 - Explant thyroïdien d'embryon de Poulet prélevé au stade de 6 jours et demi d'incubation et cultivé seul pendant 24 heures sur le milieu anhormonal. Rares structures ergastoplasmiques. Contours cellulaires enchevêtrés. *A droite :* présence d'une petite lacune intercellulaire. Les membranes cellulaires bordant la cavité montrent des microvillosités.

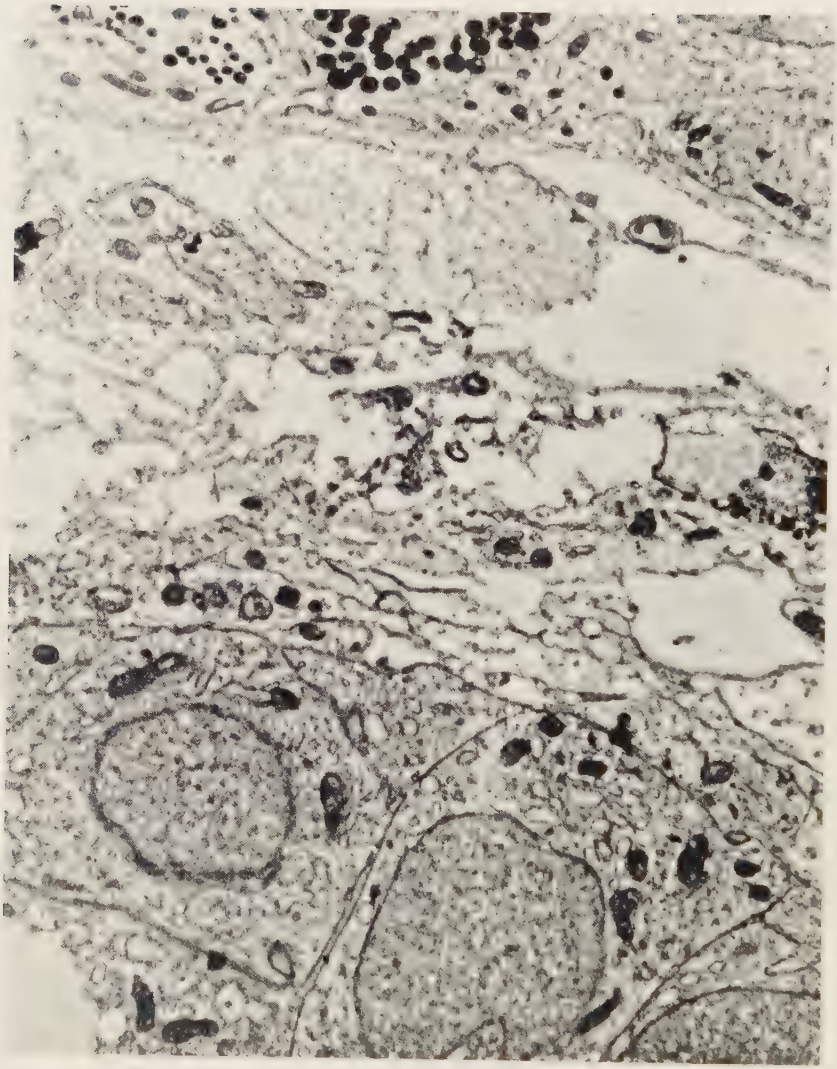


Fig. 57 - Explant thyroïdien d'embryon de Poulet prélevé au stade de 6 jours et demi d'incubation et cultivé sur le milieu anhormonal pendant 24 heures en association avec un explant préhypophysaire (région antérieure) de Cobaye adulte. *En haut :* explant préhypophysaire. Présence de cellules à granulations acidophiles. *En bas :* explant thyroïdien. Début de formation d'ergastoplasme et de lacunes intercellulaires.

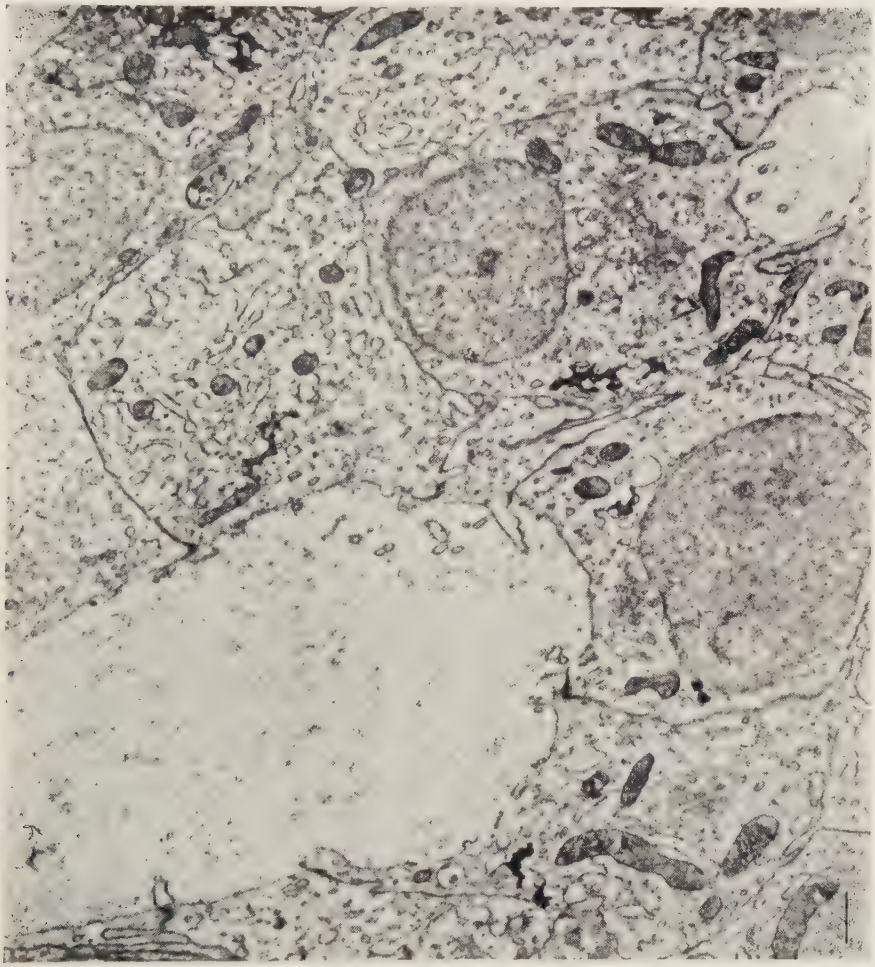


Fig. 58 - Même explant thyroïdien que figure 57. Tendance à la délimitation d'une zone golgienne. Développement net de l'ergastoplasme. Formation d'une lacune de grande taille par écartement de membranes cellulaires.

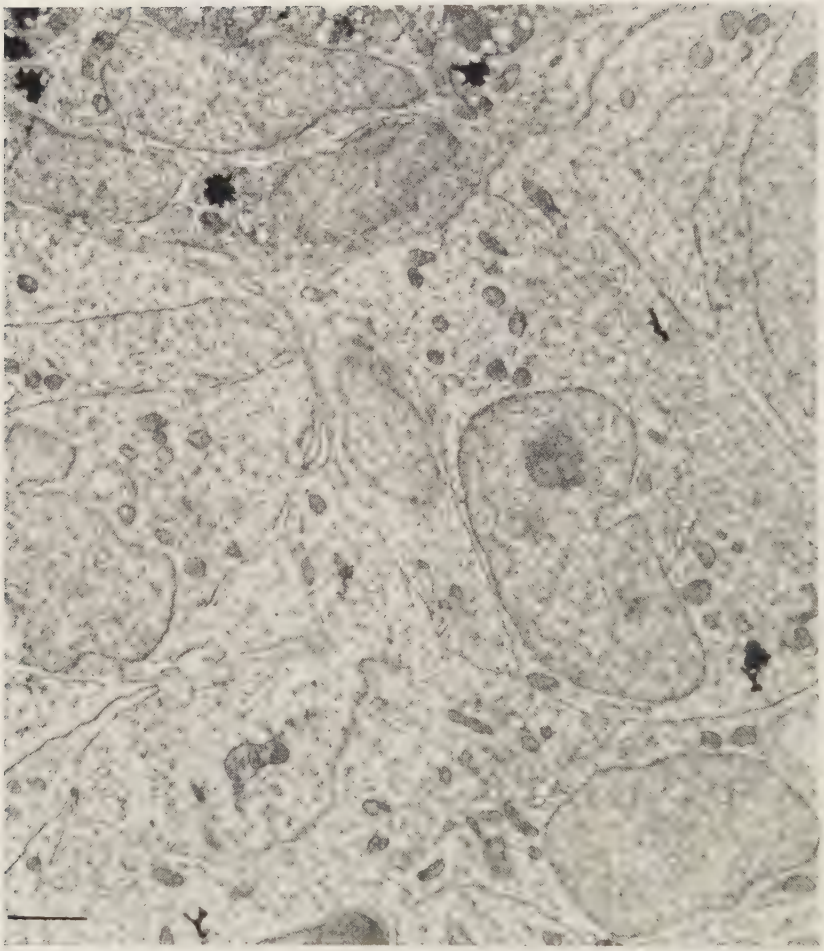


Fig. 59 - Explant thyroïdien d'embryon de Poulet prélevé au stade de 8 jours d'incubation et cultivé seul pendant 24 heures sur le milieu anhormonal. Contours cellulaires enchevêtrés. Appareil de Golgi diffus. Richesse en ribosomes libres, mais encore peu d'éléments ergastoplasmiques.

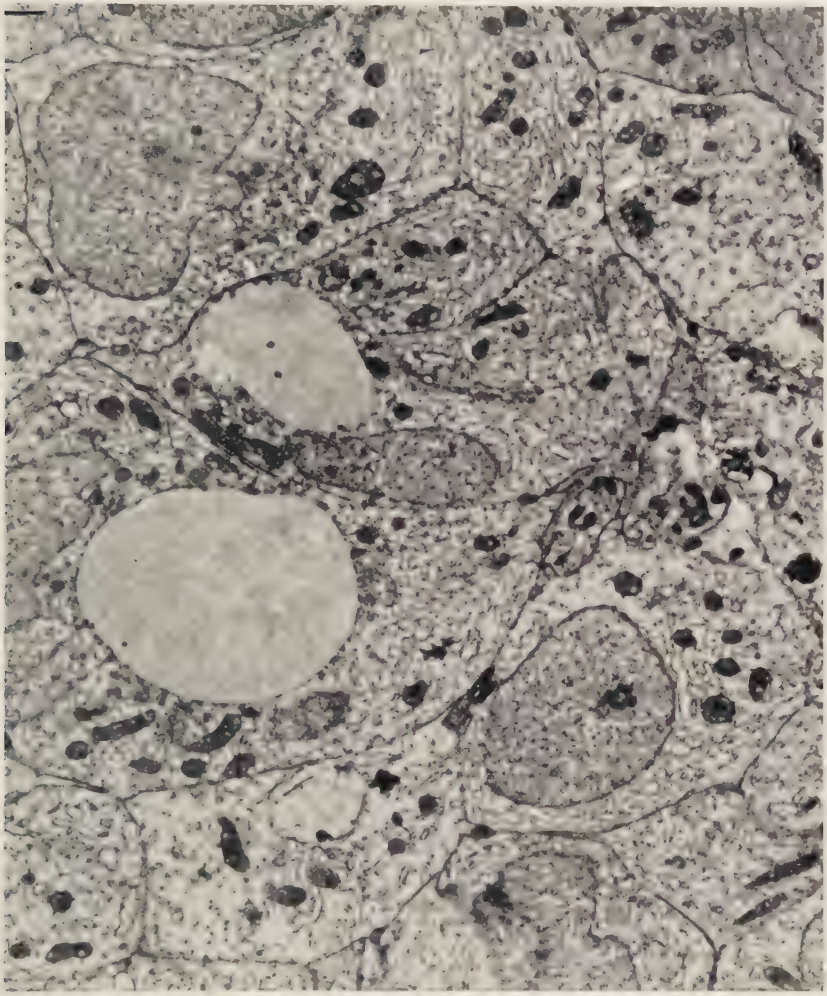


Fig. 60 - Explant thyroïdien d'embryon de Poulet prélevé au stade de 8 jours d'incubation et associé *in vitro* pendant 24 heures avec un explant préhypophysaire (région antérieure de la *pars distalis*) de Cobaye adulte. Formation simultanée d'ergastoplasme et de cavités remplies de colloïde dense.

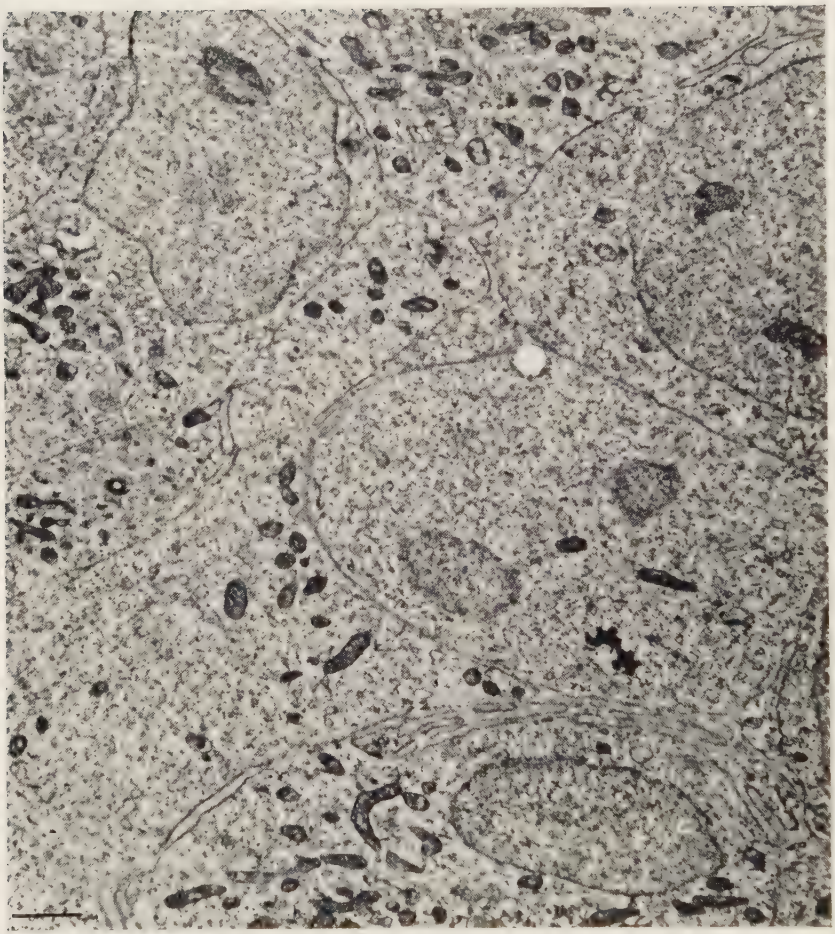


Fig. 61 - Explant thyroïdien d'embryon de Poulet prélevé au stade de 9 jours d'incubation, cultivé seul sur le milieu anhormonal pendant 3 jours. Nombreuses petites vésicules ergastoplasmiques dans le cytoplasme.

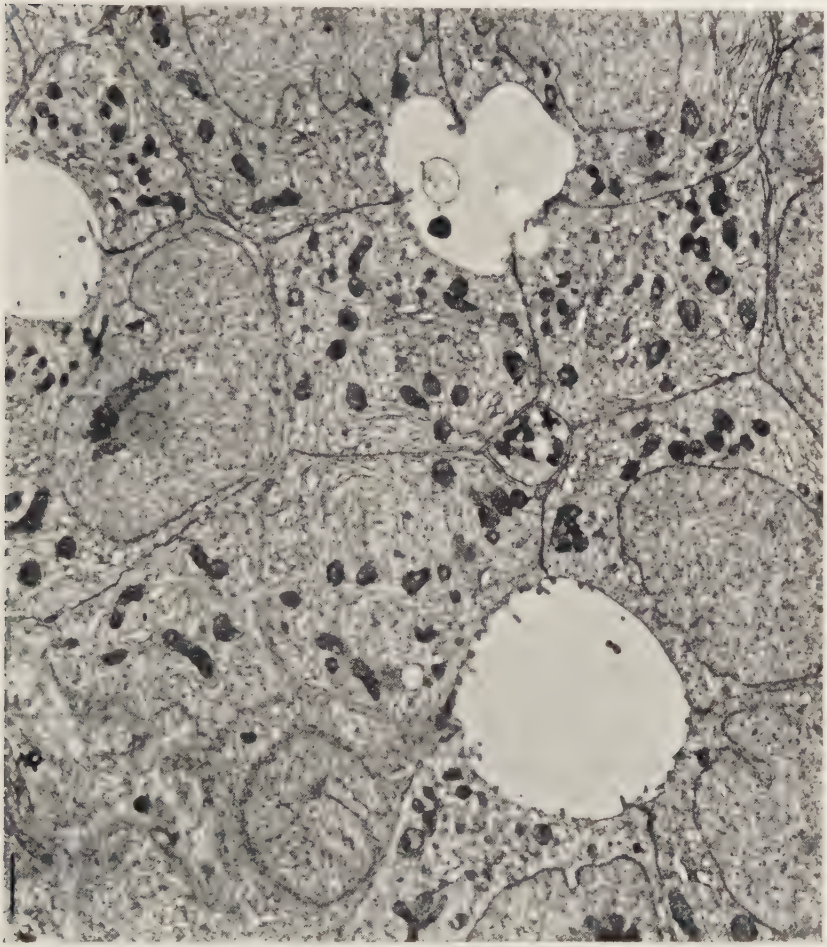


Fig. 62 - Explant thyroïdien d'embryon de Poulet prélevé au stade de 9 jours d'incubation, associé *in vitro* pendant 3 jours avec un explant préhypophysaire fraîchement prélevé chez un Cobaye adulte. Développement très marqué de l'ergastroplasme et formation de cavités colloïdes. Délimitation d'une zone golgienne. Région apicale et golgienne riche en vésicules et en granules. Images de pinocytose.

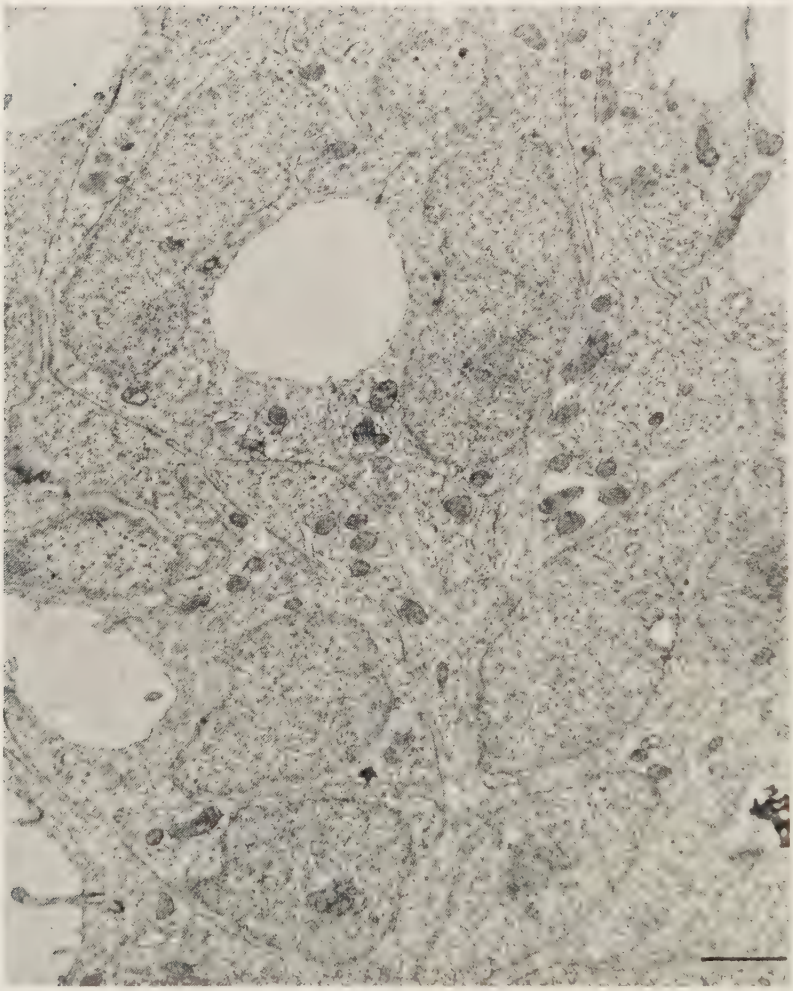


Fig. 63 - Explant thyroïdien d'embryon de Poulet prélevé au stade de 9 jours d'incubation, associé *in vitro* pendant 3 jours avec un explant préhypophysaire de Cobaye adulte préalablement cultivé pendant 19 jours. Action nette sur le développement de l'ergastoplasme, mais moins marquée que dans le cas précédent. Formation de cavités colloïdes.

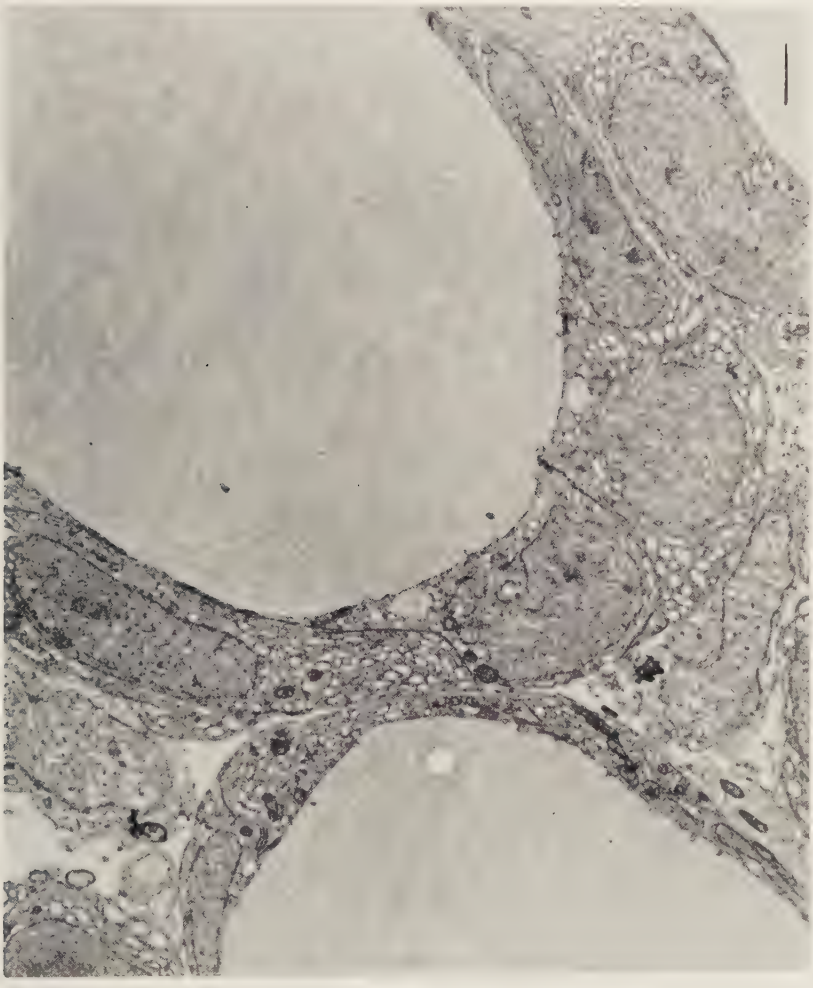


Fig. 64 - Explant thyroïdien d'embryon de Poulet prélevé au stade de 14 jours d'incubation, cultivé seul sur le milieu anhormonal pendant 24 heures. Grandes cavités colloïdes délimitées par des cellules aplaties. Quelques figures de résorption. Aspect comparable à celui de cellules en repos fonctionnel dans la glande *in situ*.

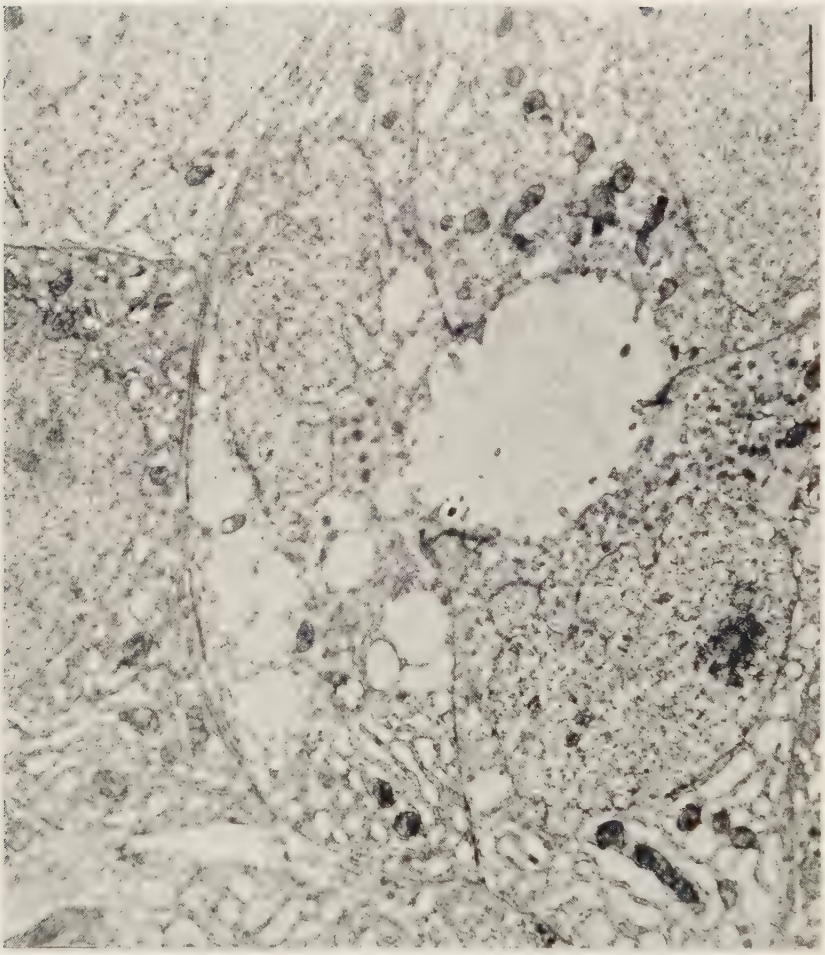


Fig. 65 - Explant thyroïdien d'embryon de Poulet prélevé au même stade que le précédent, cultivé pendant 24 heures en association avec un explant préhypophysaire (région antérieure) fraîchement prélevé. Images de résorption active : vésicules de pinocytose, granules denses, grosses vacuoles de résorption de colloïde. Les cellules perdent leur forme aplatie et augmentent progressivement de hauteur. Réduction concomitante de la taille des cavités colloïdes.

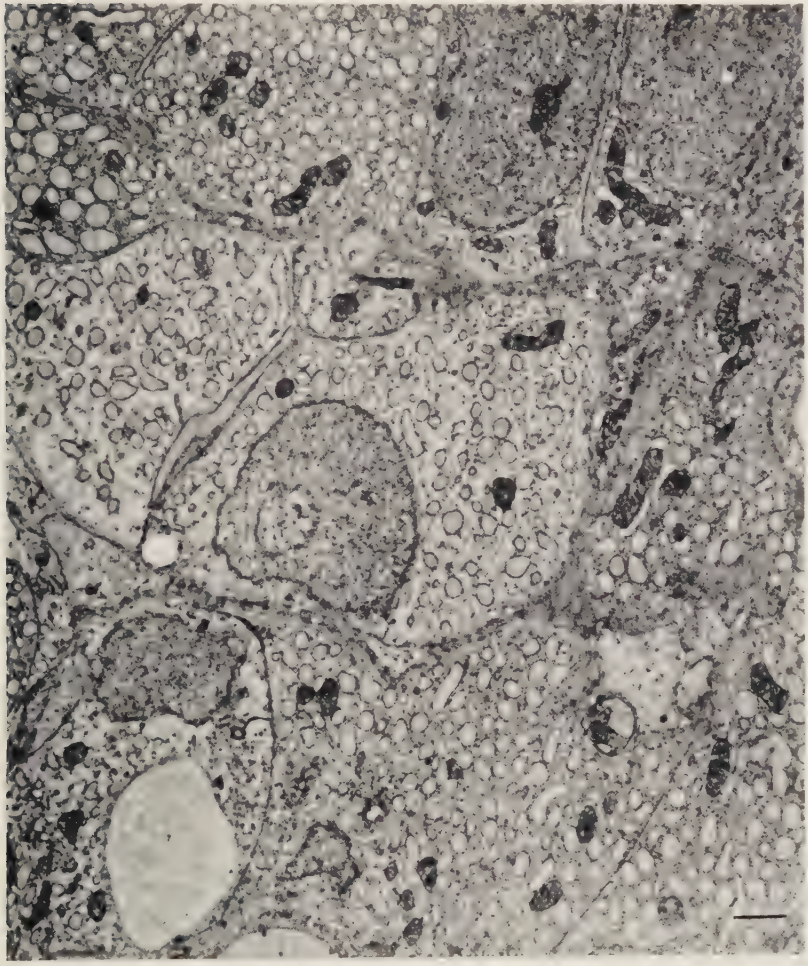


Fig. 66 - Autres aspects observés dans le même explant thyroïdien que sur la figure 65 : cellules à cytoplasme criblé de cavités ergastoplasmiques arrondies, à contenu dense. Image de forte stimulation sécrétoire. Ces cellules apparaissent « claires » au microscope optique; elles ne sont pas en contact avec la colloïde intrafolliculaire.

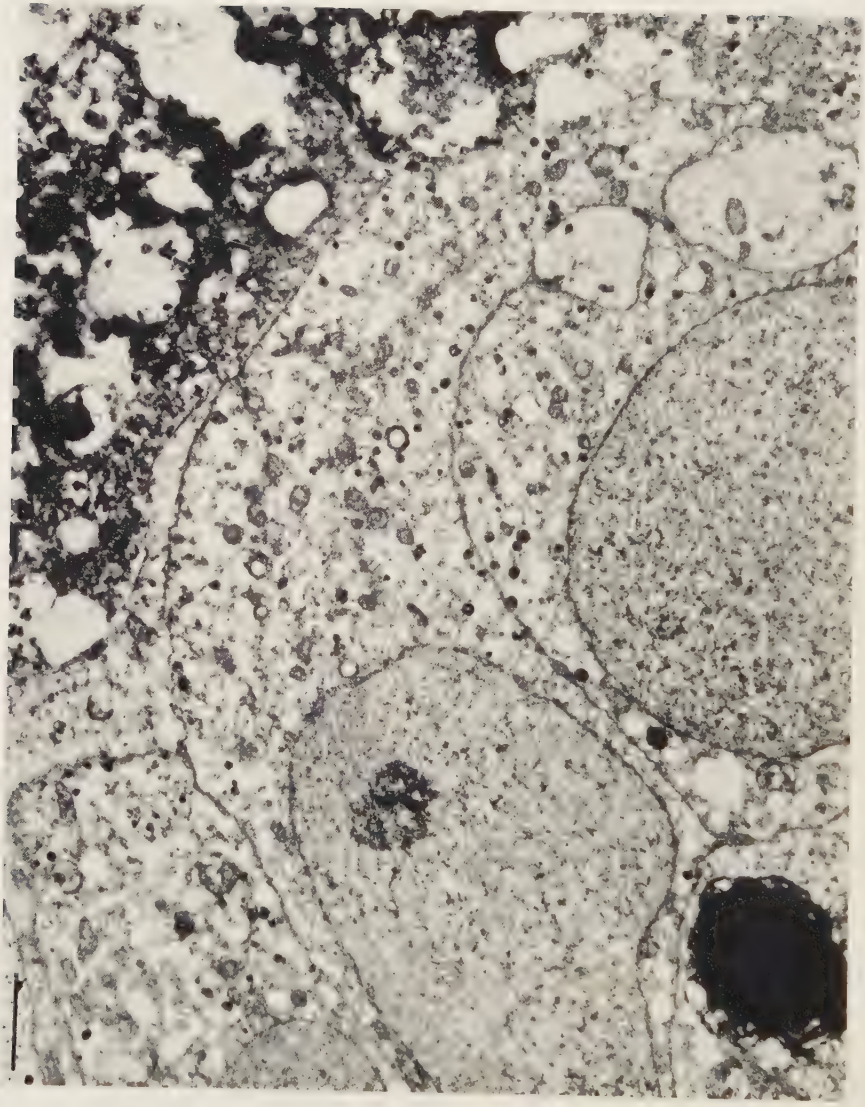


Fig. 67 - Explant corticosurrénalien de fœtus de Cobaye de 8 cm cultivé seul pendant 48 heures. Cellules glomérulaires conservées, montrant de fines mitochondries et des grains très osmiophiles. Nécrose des cellules spongiocytaires.

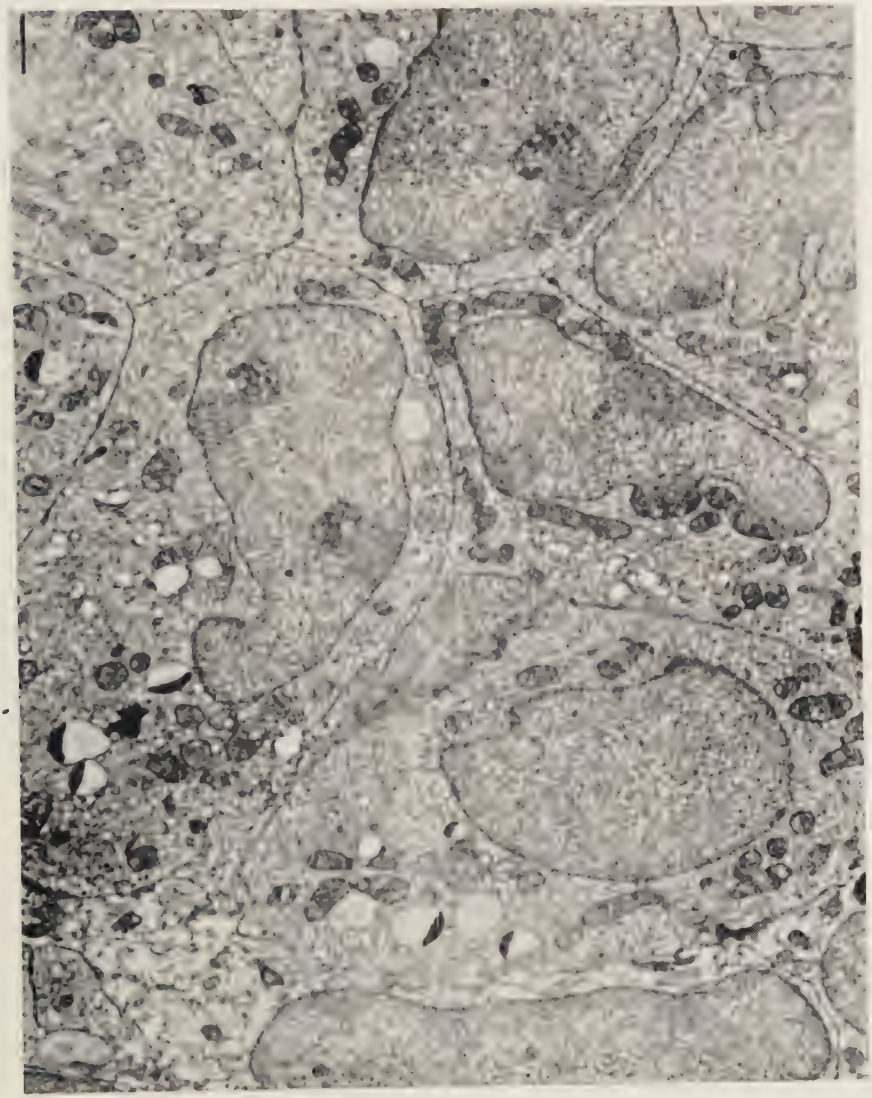


Fig. 68 - Explant corticosurrénalien de fœtus de Cobaye de 8 cm cultivé en association avec la préhypophyse de Cobaye adulte pendant 48 heures. Cellules glomérulaires hypertrophiées et sombres. Mitochondries volumineuses. Présence de vacuoles faiblement osmiophiles, montrant un dépôt dense excentrique. *En bas :* cellules capsulaires.

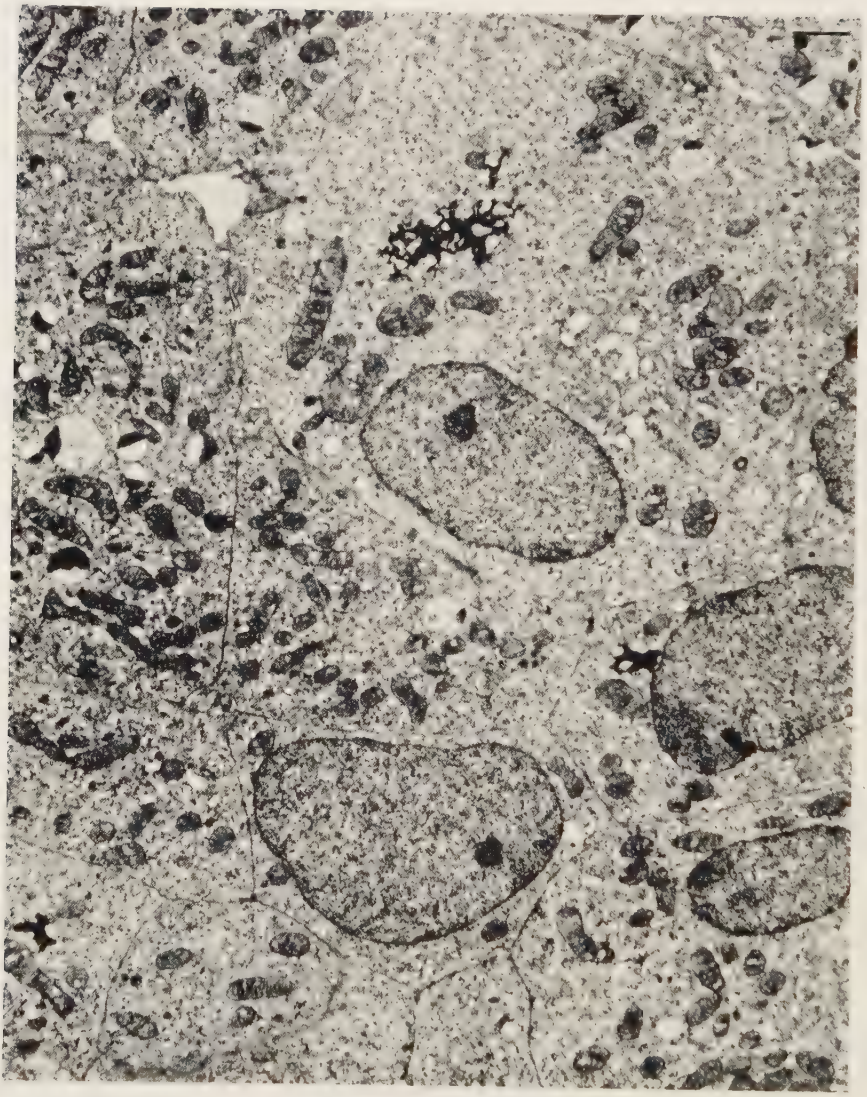


Fig. 69 - Autre explant corticosurrénalien cultivé en association avec la préhypophyse pendant 48 heures.

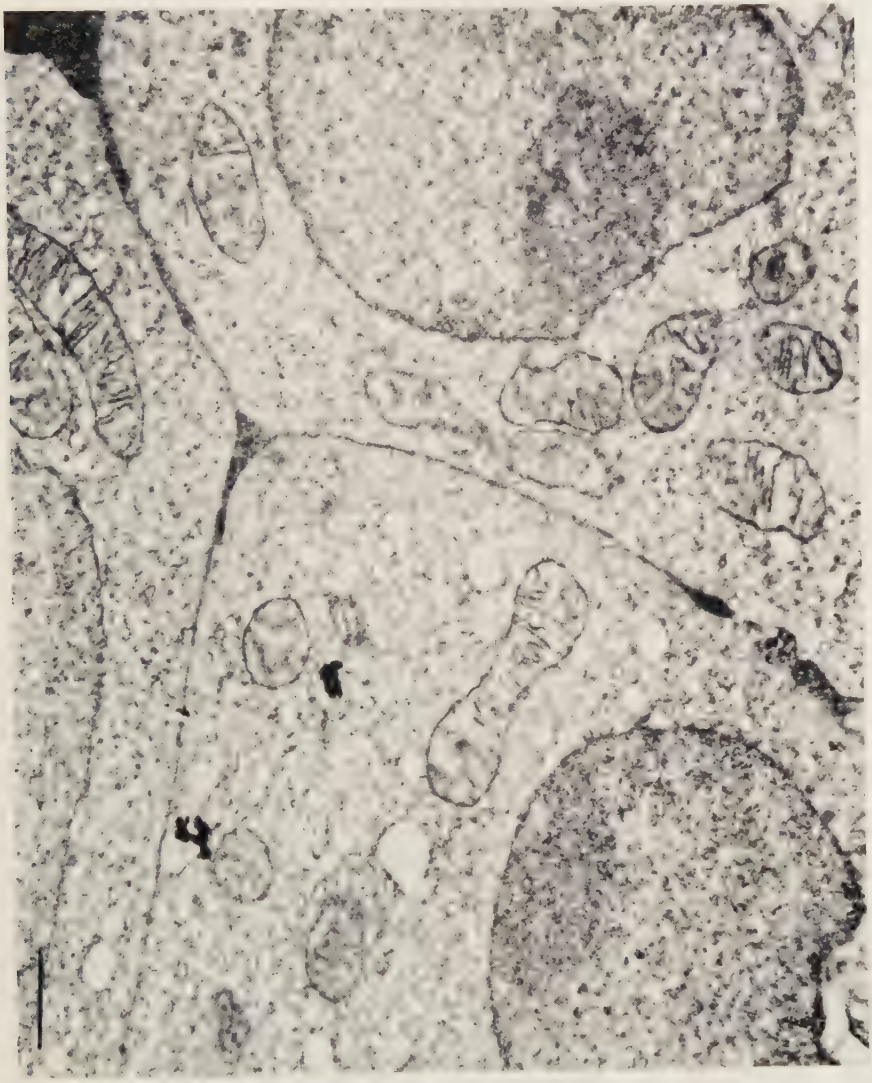


Fig. 70 - Explant corticosurrénalien cultivé en association avec la préhypophyse pendant 48 heures. Modification des mitochondries qui évoluent vers le type tubulaire.

Propositions données par la Faculté ou, éventuellement, seconde thèse :

« Les variétés cellulaires de la préhypophyse »

Strasbourg, le 8 décembre 1961

Le Président de thèse :
J. H. Vivien

Vu, Strasbourg, le 8 décembre 1961

Le Doyen :
J. H. Vivien

Vu et permis d'imprimer, Strasbourg, le 8 décembre 1961

Le Recteur de l'Académie de Strasbourg
Président du Conseil de l'Université :
J. F. Angelloz

TABLE DES MATIÈRES

I. INTRODUCTION ... 11

II. PLAN GÉNÉRAL ... 13

III. HISTORIQUE ... 14

1. **Aperçu de nos recherches antérieures sur la greffe et sur le contrôle hypothalamique de la préhypophyse** ... 14
2. **Avènement de la culture organotypique** ... 16
3. **Culture organotypique de la préhypophyse** ... 21

IV. MÉTHODES EXPÉRIMENTALES ... 23

1. **Matériel biologique** ... 23
2. **Techniques expérimentales** ... 23
   a. Culture organotypique ... 23
      1. *Préparation de l'explant* ... 23
      2 *Nature des milieux nutritifs* ... 24
      3. *Procédés de culture* ... 26
   b. Transplantation ... 26
   c. Hypophysectomie ... 26
3. **Techniques d'observation** ... 27
   a. Etudes de cellules vivantes ... 27
   b. Techniques histologiques ... 27
      1. *Fixation* ... 27
      2. *Colorations histologiques* ... 27
      3 *Réactions histochimiques* ... 27
   c. Microscopie électronique ... 28
   d. Incorporation du radioiode ... 29

V. RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX ... 30

1. **Caractères morphologiques d'explants préhypophysaires en culture organotypique** ... 30
   a. Evolution d'un explant préhypophysaire en milieu semi-synthétique ... 31
      1. *Formation d'une « membrane ». Problèmes des migrations cellulaires* ... 31
      Examen direct ... 31
      Examen histologique ... 31
      2. *Caractères anatomo-microscopiques* ... 33
      3. *Caractères cytologiques* ... 33
   b. Evolution d'un explant préhypophysaire en un milieu dit anhormonal ... 40

c. Evolution d'un explant préhypophysaire sur le mélange « milieu semi-synthétique-extrait de cerveau embryonnaire » 41

d. Conclusions 43

2. Propriétés fonctionnelles des explants préhypophysaires en culture organotypique : fonctions gonadotrope, corticotrope et thyréotrope 44

a. Association de préhypophyse avec le testicule embryonnaire 47

1. *Principes de l'expérience* 47

2. *Relations préhypophyse-testicule chez l'embryon de Poulet* 47

3. *Propriétés fonctionnelles des explants préhypophysaires associés in vitro avec le testicule embryonnaire de Poulet* .. 48

Conduite des expériences 48

Résultats 49

4. *Propriétés fonctionnelles des explants préhypophysaires de Cobaye associés in vitro avec des gonades de souriceaux nouveau-nés* 51

5. *Conclusions* 52

b. Association de préhypophyse et de cortico-surrénale 54

1. *Principes de l'expérience* 54

2. *Relations préhypophyse-corticosurrénale chez les mammifères* 54

3. *Propriétés fonctionnelles des explants préhypophysaires associés in vitro avec la corticosurrénale* 55

a. Conduite des expériences 55

b. Résultats expérimentaux 55

4. *Propriétés fonctionnelles des explants préhypophysaires de Cobaye associés in vitro avec des fragments corticosurrénaliens de Hamster* 59

5. *Conclusions* 60

c. Association de préhypophyse avec la thyroïde 61

1. *Principe de l'expérience* 61

2. *Relations préhypophyse-thyroïde chez l'embryon de Poulet* 62

3. *Propriétés fonctionnelles des explants préhypophysaires associés in vitro avec la thyroïde embryonnaire de Poulet* .. 65

Conduite des expériences 65

Etude morphologique 66

1. *Association de la préhypophyse de Cobaye avec la thyroïde explantée aux stades de 6 jours et demi et de 7 jours d'incubation* 67

2. *Association de la préhypophyse de Cobaye avec la thyroïde explantée au stade de 8 jours d'incubation* 74

3. *Association de la préhypophyse de Cobaye avec la thyroïde explantée au stade de 9 jours d'incubation* 80

4. *Association de la préhypophyse de Cobaye avec la thyroïde explantée aux stades de 14 et de 15 jours d'incubation* 80

5. *Association de la préhypophyse de Cobaye avec la thyroïde de fœtus de Cobaye* 81

6. *Association de la préhypophyse de Rat avec la thyroïde embryonnaire de Poulet* 81

7. *Discussion et conclusions* 82

Etude physiologique 83
1. *Etude de la fixation du radioiode* 84
1° Thyroïde explantée au stade de 14 jours d'incubation.. 84
2° Thyroïde explantée au stade de 15 jours d'incubation.. 90
2. *Etude des synthèses iodées* 92
3. *Discussion et conclusions* 95
d. Conclusions 96

3. Caractères cytologiques d'explants préhypophysaires greffés après culture préalable 97
a. Implantation intratesticulaire 97
1. *Expériences chez le Cobaye* 97
1° Homotransplantation d'explants préhypophysaires préalablement cultivés 97
chez l'animal normal 97
chez l'animal hypophysectomisé 99
2° Hétérotransplantation d'explants préhypophysaires préalablement cultivés 99
3° Homotransplantation d'explants préhypophysaires et corticosurrénaliens préalablement cultivés 100
2. *Expériences chez le Rat* 100
3. *Chez le Hamster* 100
b. Implantation intrathyroïdienne 102
1. *Chez le Cobaye normal* 102
2. *Chez le Cobaye hypophysectomisé* 102
c. Implantation intraovarienne 103
1. *Chez le Cobaye normal* 103
2 *Chez le Cobaye hypophysectomisé* 103
d. Discussion et conclusions 104

VI. CONCLUSIONS GÉNÉRALES 106

BIBLIOGRAPHIE 110

FIGURES 1 à 70 121

TABLE DES MATIÈRES 177

Dép. lég. Ier tr./64 - Impr. N° 1091

IMPRIMERIE ALSATIA COLMAR
10, rue Bartholdi